

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG
VON AJMALAN- UND ASPIDOSPERMAN-
ALKALOIDEN**

WALTER FAHN

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON AJMALAN- UND ASPIDOSPERMAN-
ALKALOIDEN

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Walter Fahn
aus
München

Oktober 1988

1. Referent: Prof. Dr. J. Stöckigt

2. Referent: Prof. Dr. M.H. Zenk

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.1988

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Material und Methoden.....	20
A. Material.....	20
1. Biologisches Material.....	20
1.1. Pflanzen.....	20
1.2. Pflanzliche Zellkulturen.....	20
1.3. Mikroorganismen.....	20
1.3.1. Pilze.....	20
1.3.2. Bakterien.....	21
2. Chemikalien.....	21
3. Geräte.....	23
B. Methoden.....	24
1. Darstellung von Alkaloid-Derivaten.....	24
1.1. Acetylierungen mit Acetanhydrid.....	24
1.2. Reduktionen mit Natriumborhydrid.....	24
1.3. Enzymatische Deacetylierung von Vinblastin.....	25
1.4. Alkalische Deacetylierung von Vincristin.....	25
1.5. Enzymatische Synthese von ³ H- und ¹⁴ C-Acetyl- markiertem Vindolin.....	26
1.6. Mikrobielle Transformation von Alkaloiden.....	27
2. Herstellung von Chromatographie-Medien.....	28
2.1. Kopplung eines Triazin-Farbstoffes zur Affinitätschromatographie.....	28
2.2. Epoxid-Aktivierung mit Epichlorhydrin zur Immobilisierung von Liganden.....	30
2.3. Immobilisierung von Coenzym A an epoxid- aktiviertes Fraktogel TSK HW 65 S.....	31
2.4. Kopplung von Phenol an epoxid-aktiviertes Gel zur hydrophoben Chromatographie.....	33
3. Chromatographische Verfahren zur Alkaloid- Trennung.....	34
3.1. Dünnschichtchromatographie.....	34
3.2. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie.....	35
4. Proteinbestimmung.....	36
5. Elektrophoretische Methoden.....	37
5.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
5.2. SDS-Disk-Elektrophorese.....	38
5.3. Proteinfärbung in Polyacrylamid- Dünnschichtgelen.....	39
5.4. Trägerampholyt-isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamid-Gel.....	40
5.5. Isoelektrische Fokussierung mit immobilisiertem pH-Gradienten.....	41
5.6. Präparative Trägerampholyt-isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel.....	41
5.7. Elektroelution.....	42
6. Spektroskopische Methoden.....	43
6.1. Massenspektroskopie.....	43
6.2. Kernresonanzspektroskopie.....	44
7. Computergestützte Molekülgraphik.....	45

III. Ergebnisse.....	48
A. Untersuchungen zur Abschlußreaktion der Biosynthese des Ajmalin in <i>Rauwolfia serpentina</i> Zellkulturen...	48
1. Darstellung der Substrate 17-O-Acetylnorajmalin und Norajmalin.....	48
2. Enzymtest für die Norajmalin-N _α -Methyltransferase..	51
3. Solubilisierung der partikelassozierten Methyltransferase.....	52
4. Untersuchung zur Substratspezifität der N _α -Methyltransferase.....	58
B. Untersuchungen zur Bildung von Vindolin und der Voafrine aus dem Vorläufer Tabersonin mit Enzymen von <i>C. roseus</i> Pflanzen.....	60
1. Versuche zur Intermediat-Isolierung aus <i>C. roseus</i> Fruchtwand.....	60
2. Untersuchungen mit Tabersonin zur Bildung von Vindolin und der Voafrine.....	66
2.1. Zellfreier Umsatz von Tabersonin mit <i>C. roseus</i> Enzymen.....	66
2.2. Enzymatische Dimerisierung von Tabersonin im präparativen Maßstab.....	68
2.2.1. Voafrin A und B als Referenzalkaloide für die Strukturaufklärung der Enzymprodukte...	69
2.2.2. Untersuchungen zur Struktur der Hydroxy-Voafrine.....	79
2.3. Chemische und enzymatische Reduktion der Hydroxyvoafrine.....	89
2.4. Nebenprodukte der präparativen enzymatischen Tabersonin-Umsetzung.....	90
2.4.1. Untersuchungen zur Struktur eines Tabersonin-Trimeren.....	90
2.4.2. Struktur von höher oxidierten Nebenprodukten...	97
2.5. Anreicherung der Tabersonin-verknüpfenden Enzymaktivität.....	99
2.5.1. Enzymtest für die Tabersonin-Umwandlung.....	99
2.5.2. Proteinextrakt aus <i>C. roseus</i> -Blättern.....	101
2.5.3. Chromatographische Schritte zur Anreicherung der Tabersonin-dimerisierenden Enzymaktivität.	101
2.5.4. Isoelektrische Fokussierung.....	103
2.6. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Tabersonin-Dimerisierung durch Catharanthus-Protein.....	104
2.6.1. Hemmstoffe für die Oxidation von Tabersonin...	104
2.6.2. Iminium-Tabersonin als Zwischenstufe der Kopplungsreaktion.....	106
2.7. Definierte Systeme für die Bildung von Iminium-Tabersonin.....	115
2.7.1. Photochemische Oxidation von Tabersonin.....	115
2.7.2. Die Reaktivität von Tabersonin in Systemen zur Darstellung von Iminium-Vindolin..	118
2.7.3. Darstellung von Iminium-Tabersonin mit chemischen Methoden.....	123
2.8 Tabersonin-Umsetzungen mit Vesikel- und Mikrosomenfraktionen aus <i>C. roseus</i> Blättern.....	126

2.8.1. Partikelassoziierte Proteine aus <i>C. roseus</i>	126
2.8.2. Aufschluß unter Erhalt subzellulärer Strukturen aus <i>C. roseus</i> Blättern.....	127
3. Darstellung von putativen Biosynthese- Intermediaten des Vindolin.....	129
3.1. O-Demethylierung von Vindolin mit <i>Sepedonium chrysospermum</i> ATCC 13378.....	130
3.2. Na-Demethylierung von Vindolin und Vindorosin durch <i>Streptomyces albogriseolus</i> NRRL 5748.....	131
3.3. Deacetylierung an der 17-O-Acetylgruppe.....	134
4. Untersuchungen zur enzymatischen Na- und 11-O-Methylierung mit <i>Catharanthus</i> -Enzymen.....	137
4.1. <i>In vitro</i> Umsetzung mit Demethyl-Vindolinderivaten und S-Adenosylmethionin durch <i>C. roseus</i> Proteinextrakt.....	137
4.2. Zellfreier enzymatischer Umsatz von 17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin.....	139
5. Untersuchungen zur enzymatischen 17-O-Acetylierung bei der Vindolin-Biosynthese.....	141
5.1 Zellfreier Umsatz von 17-O-Deacetylvindolin zu Vindolin.....	141
5.2. Enzymtest für die 17-O-Acetyltransferase.....	142
5.3. Zugehörigkeit der 17-O-Acetyltransferase zu den Enzymen der Vindolin-Biosynthese.....	143
5.3.1. Verteilung der Acetyltransferase in differenzierten Pflanzen von <i>C. roseus</i>	143
5.3.2. Vorkommen der Acetyltransferase in Zellkulturen von <i>C. roseus</i>	144
5.3.3. Unspezifische Esteraseaktivität für Vindolin in <i>C. roseus</i> Pflanzen und Zellkulturen.....	145
5.3.4. Deacetylierung von Vindolin durch verschiedene Enzymsysteme.....	147
5.4. Reinigung der 17-O-Acetyltransferase.....	149
5.4.1. Proteinextrakt aus <i>C. roseus</i> Blättern.....	150
5.4.2. Affinitätschromatographie der Acetyltrans- ferase an Procion Red H-3B substituiertem Fraktogel TSK HW 65 F.....	151
5.4.3. Affinitätschromatographie der Acetyltransferase an Coenzym A-substituiertem Fraktogel TSK HW 65 S.....	153
5.4.4. Hydrophobe Chromatographie an 2-Hydroxy-3-phenoxy-propyl-substituiertem Fraktogel TSK HW 65 S.....	154
5.4.5. Präparative Trägerampholyt-Isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel.....	155
5.5. Charakterisierung der Acetyltransferase.....	160
5.5.1. pH-Abhängigkeit der Acetyltransferase-Reaktion	160
5.5.2. Molekulargewichtsbestimmung der Acetyltransferase.....	161
5.5.3. Bestimmung von isoelektrischen Punkten der Acetyltransferase-Formen.....	164
5.5.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Acetyltransferase.....	165
5.5.5. Substratspezifität der Acetyltransferase.....	170
5.5.6. Abklärung der CoA-abhängigen Rückreaktion der Acetyltransferase.....	175

5.5.7. Untersuchungen zum Mechanismus der Acetyltransferase.....	177
5.5.8. Hemmstoffversuche zur Acetyltransferase- Reaktion.....	181
5.5.9. Regulation der Acetyltransferase.....	183
5.6. Untersuchungen zur Multiplizität der Acetyltransferase.....	183
5.6.1. Kontrollversuche zum Ausschluß von Isolierungsartefakten.....	183
5.6.2. Auftrennung der Acetyltransferase in zwei Untereinheiten.....	185
5.6.3. Verhalten der Acetyltransferase bei der isoelektrischen Fokussierung.....	186
5.6.4. Vorliegen einer N-terminalen Modifikation.....	186
5.7. Versuche zur Kompartimentierung der Acetyltransferase.....	187
IV. Diskussion.....	188
V. Zusammenfassung.....	212
VI. Anhang mit spektroskopischen Daten der besprochenen Alkaloide.....	217
VII. Literaturverzeichnis.....	240

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
% C	Anteil Bisacrylamid an der Acrylamidmenge
CAS	Cerammoniumsulfat (Sprühreagens)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CoA	Coenzym A
COSY	Correlated Spectroscopy
cpm	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dicyano-4,5-dichlorbenzochinon
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarisation Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI-MS	Elektronenstoßionisations-Massenspektroskopie
FAB	Fast Atomic Bombardment
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IR	Infrarot
LM	Laufmittel zur DC
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
M ⁺	Molekularion
MeOH	Methanol
MW	Molekulargewicht
MSH	β -Mercaptoethanol
NADP ⁺	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
NMR	Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Parts per million; $1 : 10^6$
R _f	Relative Laufstrecke zur DC-Front
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
% T	Konzentration Acrylamid + Bisacrylamid
Temed	N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tricin	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett
% w/v	Prozentanteile Gewicht zu Volumen

Hier nicht aufgeführte Kürzel entsprechen SI-Einheiten.

I. Einleitung

Arzneimittel pflanzlichen Ursprungs haben auch in den Industrieländern ihren festen Stellenwert behaupten können. In den USA entfiel während der letzten 25 Jahre gleichbleibend ein Viertel aller Verordnungen auf pflanzliche Arzneimittel (FARNSWORTH, 1984). Auch in der Bundesrepublik werden 12% aller eingesetzten definierten Arzneistoffe aus Pflanzen isoliert, 20% der gesamten Präparate enthalten Stoffgemische oder Reinstoffe pflanzlicher Herkunft (ROTE LISTE, 1987).

Um solche Wirkstoffe aus Pflanzen aufzufinden, ist die phytochemische und pharmakologische Untersuchung von volksmedizinisch gebräuchlichen Heilpflanzen erfolgversprechender als eine nur zufällige Auswahl (ANAND und NITYANAND, 1984). Dabei ist eine der Hauptschwierigkeiten, wenig auffällige und unvorhergesehene pharmakologische Wirkungen ungereinigter Pflanzenextrakte zu erfassen (FARNSWORTH, 1984).

Ist so ein Wirkprinzip isoliert und strukturell aufgeklärt worden, wird auch ein synthetischer Zugang zu dieser Struktur gesucht. Dient dies zunächst noch dazu, die Strukturaufklärung dieses Stoffes abzusichern, ergibt sich bald aus der Möglichkeit der Synthese auch ein Konkurrenzweg zur Gewinnung aus pflanzlichem Material. Oftmals verhindert jedoch die Komplexität von pflanzlichen Wirkstoffen eine rationelle synthetische Herstellung. So werden von 42 bei FARNSWORTH (1984) erwähnten weltweit pharmazeutisch verwendeten pflanzlichen Sekundärstoffen nur 9 nicht durch Extraktion von Drogenmaterial gewonnen. Trotzdem gehen gerade von solchen biogenen Wirkstoffen wichtige Impulse für die pharmazeutische Chemie aus, wenn sie als Leitsubstanzen zur Entwicklung neuer Arzneimittel dienen (KÖNIG, 1980). Dieses Konzept wird durch Quantifizierung von Struktur/Wirkungs-Beziehungen (KUBINYI, 1986), und Einsatz von computergestützter Molekül-Graphik (FRÜHBEIS et al., 1987) gefördert.



Die Nutzung von Arzneipflanzen als Rohstoffquelle befindet sich immer noch in einer Entwicklung von der Wildsammlung hin zum wirkstofforientierten Anbau. Domestizierung und Selektion der Pflanzen, deren Zucht, geleitet von phytochemischen Merkmalen, und die Kontrolle von Anbau und Drogengewinnung weisen dabei den Weg zu gleichbleibend qualitativ hochwertigem Pflanzenmaterial (FRANZ, 1982, 1986).

Auch die biotechnologische Gewinnung von pflanzlichen Sekundärstoffen mit Hilfe der Zellkultur-Technik steht noch am Anfang. Zwar ist die Methodik bereits etabliert, Ausgangspflanzen und davon abgeleitete Zelllinien nach ihrem Sekundärstoff-Gehalt zu selektieren; diese läßt man anschließend in optimierten Produktionsmedien die gewünschten Metabolite akkumulieren (ZENK et al., 1977). Bisher wird aber erst ein einziger Arzneistoff tatsächlich auch so produziert (FONTANEL und TABATA, 1987). Neben vereinzelten Problemen mit der Produktions-Stabilität (DEUS-NEUMANN und ZENK, 1984), sind ökonomische Erwägungen und der schwierige Übergang auf die Produktion im Großmaßstab dabei ein deutliches Hemmnis (FONTANEL und TABATA, 1987).

Mitunter jedoch verliert die entdifferenzierte Pflanzenzelle ihre Fähigkeit zur Bildung von Sekundärstoffen (TEUSCHER, 1973). Dann bietet sich als Ausweg die Anlage von Organkulturen an. Dem Vorteil der stabilen Befähigung, die gewünschten Produkte zu synthetisieren, stehen Nachteile wie langsames Wachstum und an dieses fest gekoppelte Sekundärstoff-Produktion gegenüber. Lediglich bei durch Infektion transformierten Wurzelkulturen ("hairy roots") bietet sich die Möglichkeit zur Massenkultur. Jedoch spiegeln diese in der Regel auch nur die in der Wurzel der differenzierten Pflanze aufzufindenden Metabolite wider (HAMILL et al., 1987).

Für jeden dieser Zugänge zu pflanzlichen Wirkstoffen ist das Wissen um deren Biosynthese vorteilhaft, sei es als Anregung zur biomimetischen Synthese (BRESLOW, 1972), zur Stoffumwandlung mit spezifischen Pflanzenenzymen (REINHARD und ALFERMANN, 1980), um die Dynamik der Sekundärstoff-

Zusammensetzung beim Pflanzen-Anbau zu verstehen (FRANZ, 1982), oder zur *in vivo* Beeinflussung der Syntheseleistung von Zell- und Organkulturen, etwa durch Zugabe biogenetischer Präkursoren (ZENK *et al.*, 1977; HAMILL *et al.*, 1987) sowie von Enzyminhibitoren (AMRHEIN und Mitarb., 1980). Als Perspektive für die Anwendung von Ergebnissen der Biosynthese-Forschung bietet sich weiter an, Kenntnisse über beteiligte Pflanzenenzyme mit Hilfe der Gentechnologie umzusetzen (ECKES *et al.*, 1987).

Diese Kenntnisse wurden zunächst durch Applikation radioaktiv markierter Vorstufen an die Pflanze, und nachfolgendem Nachweis eines Einbaus in den Sekundärstoff erhalten. Später konnten Umsetzungen in zellfreien Systemen und die Charakterisierung der beteiligten Enzyme unternommen werden. Als weitere Entwicklungsstufe wird die Genetik dieser Biosynthese-Wege untersucht.

Beispielhaft lassen sich all diese Zusammenhänge anhand der Indolalkaloide Ajmalin, Vindolin und Tabersonin aufzeigen.

Indolalkaloide stellen ca. 25% der in den Industriestaaten anerkannten pflanzlichen Wirkstoffe (FARNSWORTH, 1984). Mit etwa 1800 Vertretern repräsentiert diese Stoffklasse unterschiedlichste Strukturen, die wiederum eine Vielfalt pharmakologischer Wirkungen bedingen (NEUSS, 1980).

Die indische Heilpflanze *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz, Apocynaceae, schon in der vorvedischen Medizin vor über 3000 Jahren zur Behandlung von Schlangenbissen, Fieber und Geisteskrankheit eingesetzt (SAHU, 1979), wurde in den dreißiger Jahren unseres Jahrhunderts phytochemisch untersucht. Dabei wurden neben Reserpin und Raubasin das antiarrhythmisch wirkende Ajmalin isoliert (SIDDIQUI und SIDDIQUI, 1931). Die genaue, hexacyclische Struktur wurde abschließend 1961 von BARTLETT und Mitarbeitern geklärt (Abbildung 1).

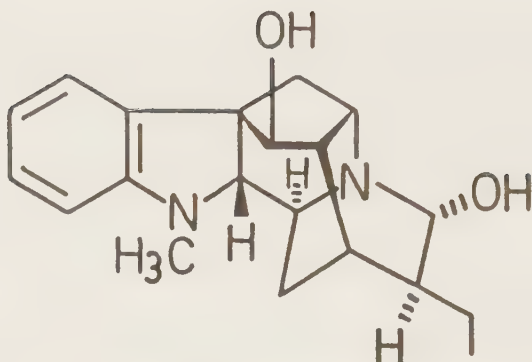
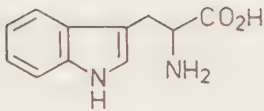


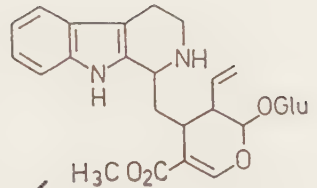
Abbildung 1: Ajmalin

Neben Totalsynthesen von MASAMUNE et al. (1967) und MASHIMO und SATO (1969) wurde von VAN TAMELEN und OLIVER (1970) eine biomimetische Synthese durchgeführt, die auf einer nur im Detail falschen Vorstellung zur Biosynthese dieses Alkaloids beruhte. Nicht nur *Rauwolfia serpentina*, bei der Ajmalin besonders in der Wurzelrinde lokalisiert ist (ARENS et al., 1986), sondern noch 30 weitere *Rauwolfia*-Arten und die ebenfalls zur Familie der Hundsgiftgewächse zählenden *Aspidosperma spegazzini* und *Melodinus balansae*, weisen Ajmalin auf (COURT, 1983; KOSKINEN und LOUNASMAA, 1983). Auch in von *R. serpentina* angelegten Zellsuspensionskulturen ließ sich Ajmalinproduktion von STÖCKIGT und Mitarbeitern (1981) nachweisen. Hauptprodukt ist jedoch das Glucoalkaloid Raucaffricin, in *R. serpentina*-Wurzeln unbekannt (SCHÜBEL und STÖCKIGT, 1984).

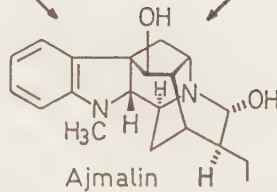
Nachdem durch Fütterung an *Rauwolfia*-Pflanzen der Einbau von radioaktiv markiertem Tryptophan (LEETE, 1960), sowie Methionin (BARTON et al., 1965), Loganin (BATTERSBY et al., 1968) und Strictosidin (NAGAKURA und Mitarb., 1979) ins Ajmalin nachgewiesen werden konnte (Schema 1), war die Herkunft der Gerüstbausteine bereits gesichert. Demnach stammt der Indolteil aus Tryptophan, der restliche C₉-Körper in Übereinstimmung mit der Hypothese von THOMAS (1961) und WENKERT (1962) aus dem Terpenoid-Stoffwechsel, sowie die N-Methylgruppe aus Methionin.



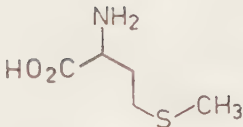
Tryptophan



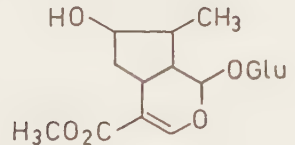
Strictosidin



Ajmali



Methionin



Loganin

Schema 1: Einbau von Vorstufen in Ajmalin

Eine weitere Bearbeitung des Biosynthesewegs des in der Wurzel gebildeten Ajmalin wurde erst durch die Bereitstellung von genügend, biosynthetisch aktivem Pflanzenmaterial durch die Zellkultur-Technik ermöglicht. So gelang es A. PFITZNER (1984), den gesamten Weg zwischen Strictosidin und Ajmalin festzulegen, wobei er zwei Enzyme charakterisieren und drei weitere Enzymaktivitäten *in vitro* auffinden konnte (Schema 2). Auch wurde aus *Rauwolfia serpentina* Zellsuspension eine Monoterpen-Cyclase-Aktivität (UESATO et al., 1986) aufgefunden und das Enzym Strictosidinsynthase charakterisiert (HAMPP, 1986), das das zentrale Intermediat für die Indolalkaloid-Biosynthese bereitstellt (STÖCKIGT und ZENK, 1977).

Catharanthus roseus (L.) G. DON (*Vinca rosea* (L.)) ist von Madagaskar aus als Zierpflanze weltweit verbreitet worden. Volksmedizinisch waren hier Zubereitungen aus dem Kraut gegen die Zuckerkrankheit eingesetzt worden. Bei der Überprüfung dieser Wirkung wurde im Tierversuch aber eine Verminderung der weißen Blutkörperchen festgestellt. Dies führte zur Entdeckung der in der Krebsterapie bewährten Cytostatika Vinblastin und Vincristin. Vindolin, das Hauptalkaloid der Blätter, blieb trotz seiner hypoglykämischen Wirkung therapeutisch irrelevant (Zusammenfassung bei SVOBODA und BLAKE, 1975).

Interesse an dem *Aspidosperma*-Alkaloid Vindolin besteht aber aufgrund seiner Verwandtschaft mit Vinblastin und Vincristin; so sind diese beiden dimeren Indolalkaloide aus einer Vindolin- und einer Carbomethoxy-Velbanamin-Teilstruktur zusammengesetzt (Abb. 2).

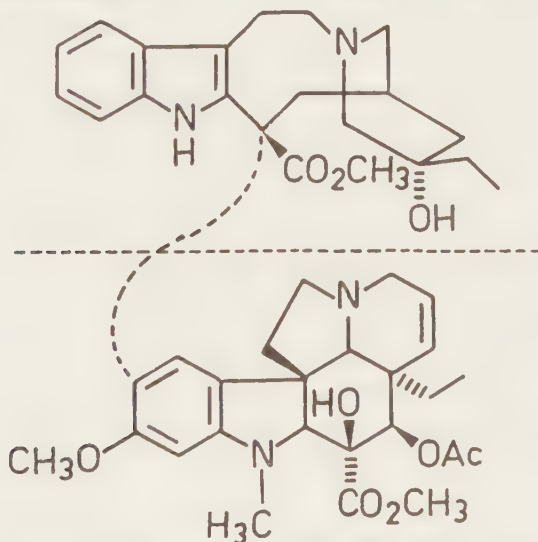


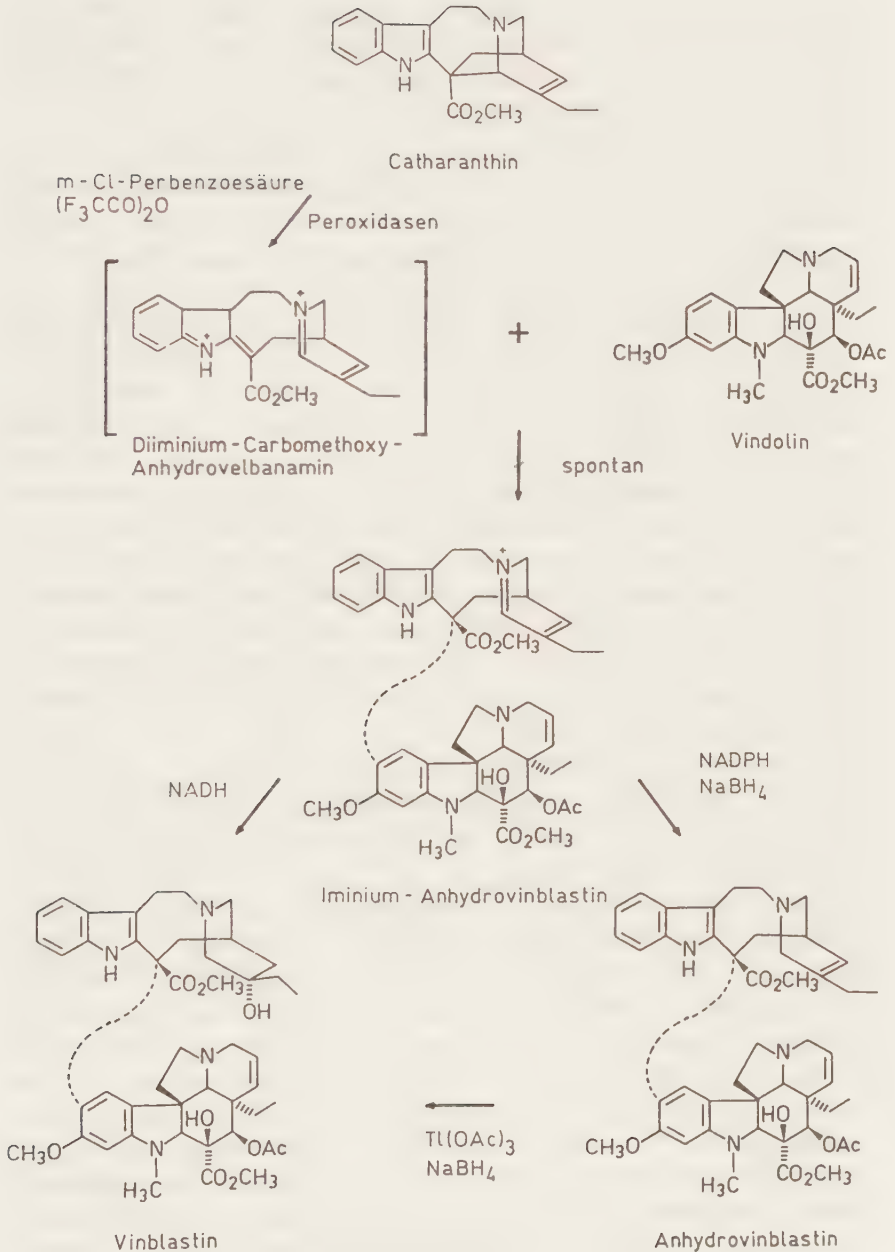
Abbildung 2: Vinblastin; der untere Teil des Moleküls ist Vindolin

Die Isolierung (GORMAN et al., 1959; SVOBODA und Mitarb., 1959) und Strukturaufklärung von Vindolin (GORMAN et al., 1962) beschleunigte wesentlich die Erkenntnisse über den Aufbau dieser komplexen Dimeren (NEUSS et al., 1962, 1964).

Außer in *Catharanthus roseus* ist Vindolin noch in *C. longifolius* (RASOANAIVO et al., 1972), *C. lanceus*, *C. ovalis* und *C. pusillus* (TIN-WA und FARNSWORTH, 1975) aufgefunden worden. Neben Synthesen für Vindolin von ANDO et al. (1975), KUTNEY und Mitarbeitern (1978), ANDRIAMIALISOA et al. (1982, 1985) sind aus biogenetischer Sicht Partialsynthesen aus Methoxytabersonin (DANIELI et al., 1984) und Tabersonin (DANIELI und Mitarb., 1987), sowie eine biomimetische Synthese über 14-Hydroxyseccodin (KUEHNE et al., 1987) besonders bemerkenswert. Hier haben Biosynthese-Kenntnisse den synthetischen Zugang zu diesem Alkaloid weitgehendst beeinflusst.

Dagegen hat die erfolgreiche chemische Kopplung von Vindolin und Catharanthin, einem weiteren *Catharanthus*-Alkaloid, zu Anhydrovinblastin (LANGLOIS et al., 1976; KUTNEY und Mitarb., 1976) zu Vorstellungen über die Biogenese der dimeren *Catharanthus*-Alkaloide inspiriert. So fanden HASSAM und HUTCHINSON (1978) durch Fütterung an *C. roseus*-Pflanzen Einbau von Catharanthin, SCOTT et al. (1978) von Catharanthin und Vindolin in Anhydrovinblastin. In einem zellfreien System wurde diese Kopplung von STUART und Mitarbeitern (1978 a) und KUTNEY et al. (1982) nachgewiesen. Proteinextrakt aus Zellkulturen zeigte sich bei MCLAUCHLAN et al. (1983) sowie KUTNEY (1987) zu dieser Umsetzung befähigt. Schließlich wurde diese Verknüpfung auf Peroxidasen aus *C. roseus* zurückgeführt (MISAWA und Mitarb., 1988) und diese aus *C. roseus* Zellkultur gereinigt (ENDO et al., 1988). Aber auch andere als *Catharanthus*-Enzyme bewerkstelligen diese Reaktion (GOODBODY et al., 1988 a, 1988 b).

Weiterhin konnte die Umwandlung von Anhydrovinblastin zu Vinblastin durchgeführt werden. So gelang MANGENEY et al. (1979) die chemische Umsetzung, STUART und Mitarbeiter (1978 b) zeigten diese Transformation in einem Fütterungsexperiment in *C. roseus* Pflanzen. KUTNEY et al. (1982) erhielten dasselbe Ergebnis mit einem zellfreien Pflanzenextrakt; MCLAUCHLAN et al. (1983) genügte bereits ein Proteinextrakt aus Zellkultur von *C. roseus*. Auch hier wurde



Schema 3: Kopplung von Catharanthin und Vindolin (nach KUTNEY)

schließlich eine NADH-abhängige Enzym-Aktivität aufgefunden (ENDO und Mitarb., 1987 a), so daß der Weg von Vindolin zu Vinblastin (Schema 3) chemisch und biogenetisch verstanden ist (KUTNEY et al., 1988 a, 1988 b).

Trotz Möglichkeit der Synthese blieb die Isolierung von Vinblastin und Vincristin aus *C. roseus*-Droge ökonomischer (CZYGAN, 1985), jedoch wurde die Extraktions-Methodik laufend verbessert. Lieferte das ursprüngliche Verfahren von SVOBODA (1964) nur $2,8 \times 10^{-4}\%$ Vinblastinsulfat aus dem Kraut, so sorgten JOVANOVIĆ et al. (1971) für eine Steigerung auf $3,3 \times 10^{-2}\%$ aus Blättern, in Konkurrenz mit den Methoden von SHETE et al. (1984) mit $4 \times 10^{-2}\%$ und von RAHMAN und Mitarbeitern (1982) mit $2,5 \times 10^{-2}\%$ Ausbeute. Eine weitere Verbesserung erbrachte erst die Anwendung von Erkenntnissen über die Biosynthese dieses Alkaloids, nämlich das Vorliegen des primären Kopplungsproduktes aus Vindolin und Catharanthin als Iminium-Salz (GOODBODY et al., 1988 a; KUTNEY und Mitarb., 1988 a). Mit einem modifiziertem Extraktionsverfahren konnten $2,3 \times 10^{-1}\%$ Anhydrovinblastin gewonnen werden (GOODBODY et al., 1988 c). Dieses kann, wie ausgeführt in Vinblastin, und dies weiter zu Vincristin (JOVANOVIĆ et al., 1974) umgewandelt werden.

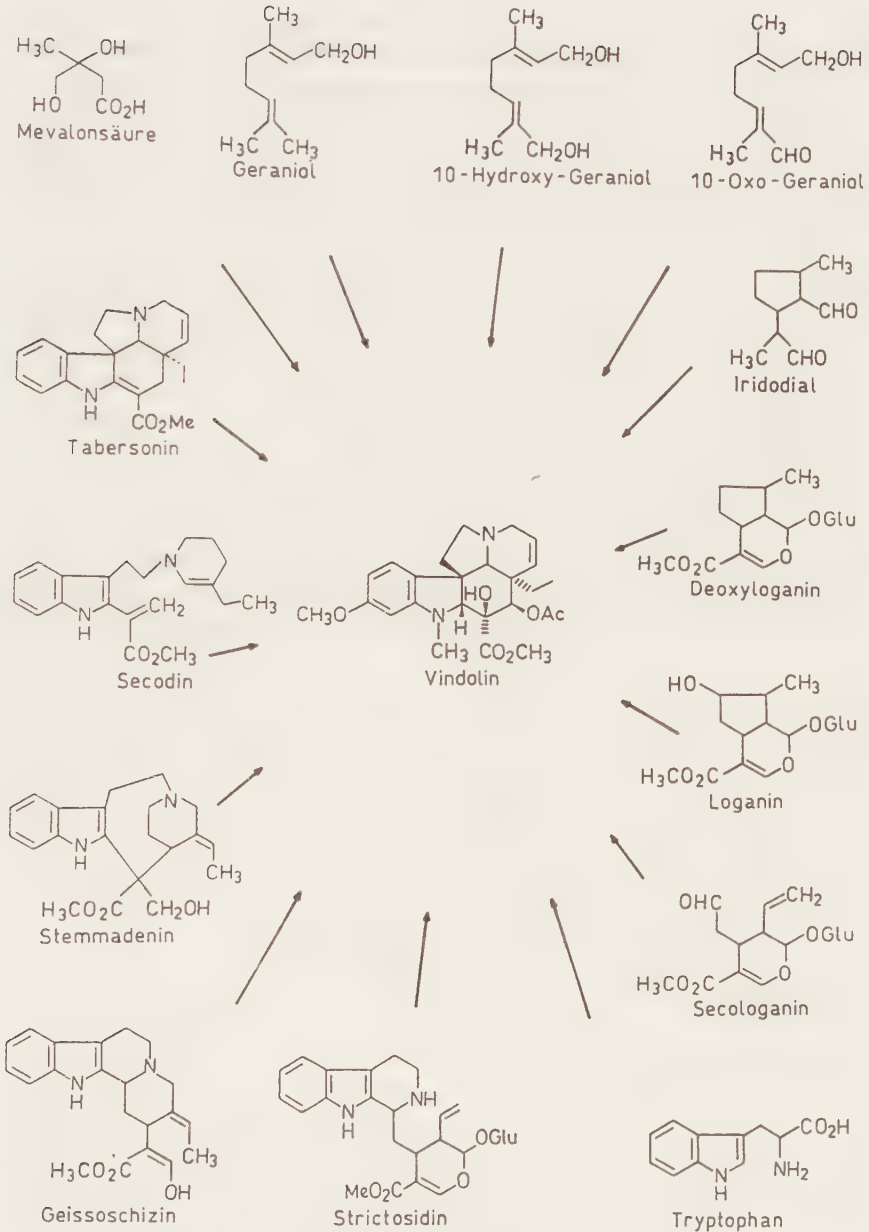
Wie die Pflanze, so sind auch Zellkulturen von *C. roseus* intensiv phytochemisch bearbeitet worden. Dabei fanden sich zwar auch Alkaloide, die in der differenzierten Pflanze nicht nachzuweisen waren (PÉTIARD et al., 1982, KOHL und Mitarb., 1983). Jedoch wurden in Zellsuspensionen keine dimeren Indolalkaloide und kein Vindolin aufgefunden, wogegen Catharanthin zu detektieren war (KURZ et al., 1980; KUTNEY und andere, 1980 a; STÖCKIGT und SOLL, 1980; KOHL und Mitarb., 1981). Lediglich SCOTT et al. (1980) fanden in ihrer Zellkultur Vindolin vor, was sie aber nur durch Isotopenverdünnungs-Analyse belegen konnten. Selbst empfindlichste Nachweismethoden wie Radioimmuno-Assays gegen Vindolin (KUTNEY et al., 1980 b; WESTEKEMPER und Mitarb., 1980; LAPINJOKI und andere, 1987) vermochten nur in Ausnahmefällen Vindolin anzuzeigen (LAPINJOKI et al., 1987).

Immer war jedoch Ajmalicin ein Hauptprodukt alkaloid-produzierender Zelllinien. Betrachtet man die differenzierte Pflanze, so ist Vindolin dort in den Blättern (WESTEKEMPER et al., 1980), und zwar in Mesophyll-Idioblasten (MERSEY und CUTLER, 1986) konzentriert. Dagegen ist Catharanthin in den Vindolin-freien Wurzeln lokalisiert (DEUS-NEUMANN et al., 1987).

Diese Differenzierung nach Pflanzenorganen berichteten auch RICHTER et al. (1965), die in primären Kalli, von Stengel- und Blattgewebe abgeleitet, Vindolin nachweisen konnten, aber nicht im Kallus von Wurzelgewebe. Weitere Zusammenhänge zwischen Vindolin-Produktion und Zelldifferenzierung erbrachten die Versuche von MORRIS (1986 a). Dieser Autor konnte zeigen, daß Mesophyllzellen mit zunehmender Entdifferenzierung zum Kallus Vindolin abbauen, ein Verhalten, daß auch an Zellsuspensionen beobachtet wurde (CAREW und KRÜGER, 1977). Auch verloren solche Mesophyllzellen beim Übergang zum Kallus die Fähigkeit, 3',20'-Dehydrovinblastin zu tolerieren (CONSTABEL et al., 1981). In Organkulturen dagegen bleibt die Vindolin-Biosynthese erhalten. So zeigten aus Vindolin-freien Zellkulturen rückdifferenzierte Sproßkulturen wieder Vindolin-Synthese. Diese Resultate belegten, daß zwar vorhandene Gene dieses Biosynthese-Weges lediglich in Zellkultur nicht exprimiert worden waren (CONSTABEL et al., 1982). Und während Wurzelkulturen ebenfalls Vindolin nicht synthetisierten (ENDO et al., 1987 b), besaßen Blattkulturen (KRUEGER et al., 1982), Sproßkulturen (ENDO und andere, 1987 b) sowie multiple Sproßkulturen (HIRATA et al., 1987) gleichermaßen noch Vindolin als Inhaltsstoff.

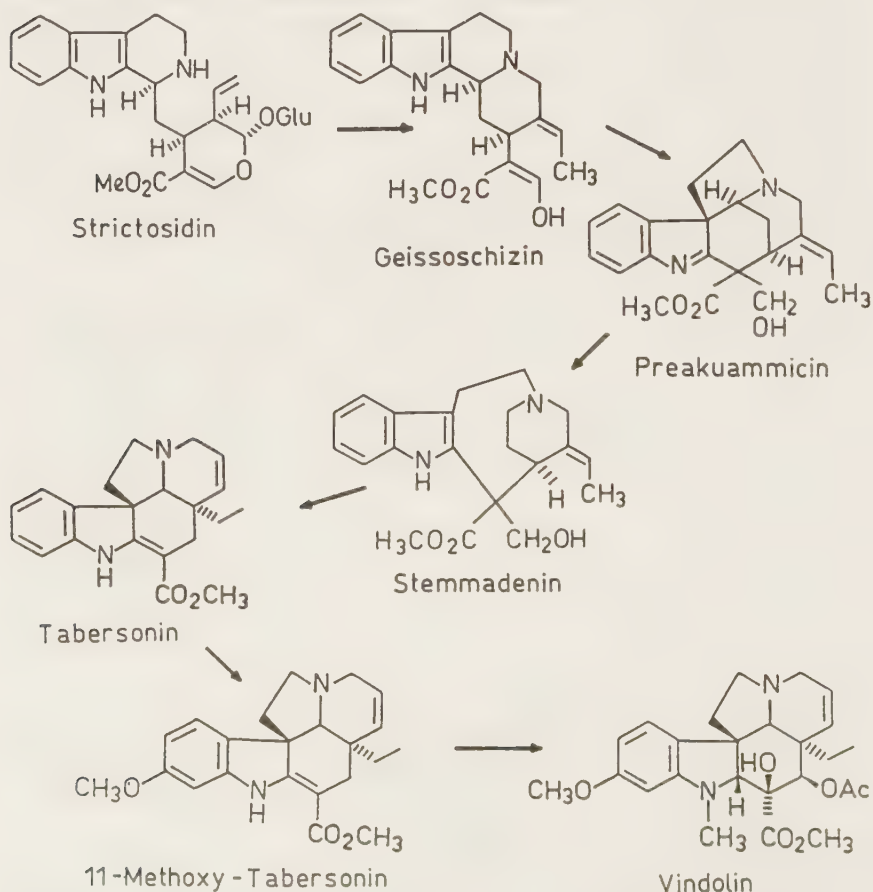
Im Gegensatz zu ihrer Verknüpfung mit der Zelldifferenzierung ist der Weg der Vindolin-Biosynthese, ebenso wie der Ajmalin-Weg, in den Grundzügen bereits bekannt. Gerade *Catharanthus roseus* war das Versuchsobjekt der Wahl, um die Bildung von Indolalkaloiden zu erforschen. Leichte Verfügbarkeit, Robustheit, sowie Alkaloid-Reichtum mit über 100 Indolalkaloiden, die vier verschiedene Grundgerüste beinhalten, machten diese Pflanze für Fütterungsversuche

geradezu ideal (SCOTT, 1970). So wurde der Einbau von Tryptophan in Vindolin schon 1965 von LEETE *et al.* bewiesen. Der monoterpenoide Ursprung (THOMAS, 1961; WENKERT, 1962) des anderen Gerüstbausteins im Vindolin wurde, oftmals gleichzeitig von verschiedenen Arbeitsgruppen, Schritt für Schritt durch radioaktiv markierte Vorstufen belegt. So konnte mit dem Einbau von Mevalonsäure in Vindolin der Grundstein für weitere Fütterungsexperimente gelegt werden (GOEGGEL und ARIGONI, 1965; MCCAPRA und Mitarb., 1965; BATTERSBY und andere, 1966 a). Geraniol wurde als weiterer Vindolinvorläufer (BATTERSBY *et al.*, 1966 b; HALL und andere, 1966; LEETE und UEDA, 1966; LOEW und Mitarb., 1966) vor 10-Hydroxygeraniol (BATTERSBY *et al.*, 1970 a; ESCHER und Mitarb., 1970) und 10-Oxogeraniol (BATTERSBY und andere, 1981) ermittelt. Weiter ließ sich der Weg zum Vindolin durch Fütterung von Iridodial (UESATO *et al.*, 1984), Deoxyloganin (INOUE *et al.*, 1969; BATTERSBY und andere, 1970 b), Loganin (BATTERSBY *et al.*, 1968; LOEW und ARIGONI, 1968), Secologanin (BATTERSBY *et al.*, 1969 a) und Strictosidin (STÖCKIGT und ZENK, 1977) verfolgen. Erst ab Strictosidin ist dieser Weg nicht mehr von universeller Gültigkeit für monoterpenoide Indolalkaloide. Von hier weiter speziell zum Vindolin wiesen Fütterungen von Geissoschizin (BATTERSBY und HALL, 1969 b; SCOTT, 1970), Stemmadenin (QURESHI und SCOTT, 1968), Secodin (KUTNEY *et al.*, 1971; SCOTT, 1970) und Tabersonin (QURESHI und SCOTT, 1968), wie in Schema 4 beschrieben.



Schema 4: Einbau von Vorstufen in Vindolin

Neben das Konzept, applizierte radioaktive Vorläufer im Endprodukt der Biosynthese-Sequenz nachzuweisen, trat die Isolierung solcher Intermediate aus der Pflanze. So wurde Secologanin von Battersby et al. (1969 a) isoliert. Besonders aufschlußreich war dabei jedoch die sequentielle Isolierung von Alkaloiden während der Samenkeimung (QURESHI und SCOTT, 1968). In diesem Experiment konnte das Auftreten der Vindolin-Vorläufer in der Reihenfolge Strictosidin (als C-3-Epimere Vincosid identifiziert), Geissoschizin, Preakuammicin, Stemmadenin, Tabersonin, Methoxytabersonin, und schließlich Vindolin selbst aufgezeigt werden (Schema 5).



Schema 5: Sequentielle Isolierung von Vindolin-Vorstufen

Auch mit zellfreien Systemen konnte die Bildung von Intermediaten des Vindolin-Weges erreicht werden. So zeigten SCOTT und LEE (1975) die Entstehung von Geissoschizin aus Tryptamin und Secologanin mit Pflanzen-Proteinextrakt. Die Reaktion weiter zum Vindolin in diesem System wurde zwar berichtet (STUART et al., 1978 c; KUTNEY und Mitarb., 1982), konnte aber in einer späteren Untersuchung nicht bestätigt werden (STÖCKIGT et al., 1985). Auch mit kultivierten Pflanzenzellen als Proteinquelle ließ sich die Bildung von Geissoschizin (SCOTT und LEE, 1975) und von Strictosidin (STÖCKIGT und ZENK, 1977) aus Tryptamin und Secologanin *in vitro* verfolgen. Enzyme der Indolalkaloid-Biosynthese konnten schließlich aus der Pflanze in Gestalt der Nerol/Geraniol-10-Hydroxylase (MEEHAN und COSCIA, 1973) und der Loganinsäure-Methyltransferase (MADYASTHA et al., 1973) charakterisiert werden. Aus Zellsuspensionen, die zwar Tabersonin, aber kein Vindolin enthalten (STÖCKIGT und SOLL, 1980), wurden die Strictosidin-Synthase (TREIMER und ZENK, 1979; U.PFITZNER, 1984) und die Strictosidin-Glucosidasen (HEMSCHIED und ZENK, 1980) untersucht.

Tabersonin als Prototyp eines *Aspidosperma*-Alkaloids (Abbildung 3) ist nicht nur als bereits nah verwandtes Biosynthese-Intermediat des Vindolin von Interesse.

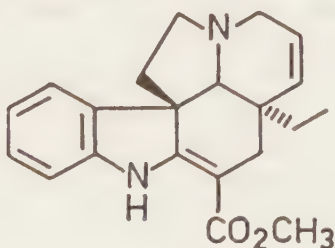
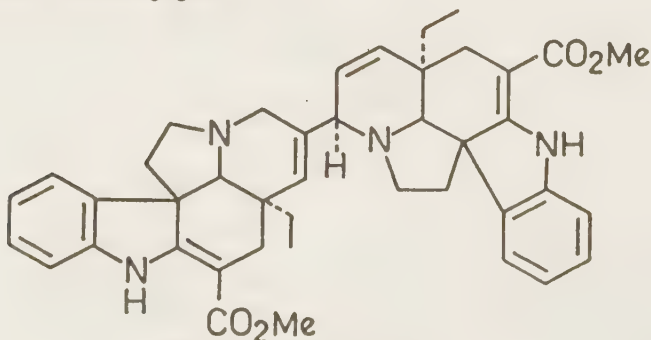


Abbildung 3: Tabersonin

Im Gegensatz zu *C. roseus*, wo es als Vorläufer des Hauptalkaloids nur in Spuren auftritt, ließ es sich in *Amsonia tabernaemontana* als ein vorherrschendes Alkaloid entdecken (JANOT et al., 1954). Auch in den Apocynaceen *Amsonia*

angustifolia, *Melodinus balansae*, *M. celastroides*, *M. scandens*, *Pandaca retusa*, *Voacanga africana*, *V. grandifolia* (CORDELL, 1979) und *Hazunta modesta* (BUI et al., 1980) ist Tabersonin aufzufinden. Weil es durch Partialsynthese in das durchblutungsfördernde Vincamin umzuwandeln ist (CALABI et al., 1982; KEVE und Mitarb., 1982; VITALI und FIGHI, 1984), ist es auch als Synthesebaustein begehrt. Selbst kann es durch Synthesen von ZIEGLER und BENNET (1973) und TAKANO et al. (1976) erhalten werden; dabei ist die biomimetische Synthese über Hydroxysecodin (KUEHNE und PODHOREZ, 1982) besonders eng an die Biogenese angelehnt. Als Rohstoff wird Tabersonin aber aus *Amsonia*- und *Voacanga*-Arten sowie aus *Rhazya orientalis* erhalten (ZSADON, 1982).

Auch in Zellkulturen von *Rhazya stricta*, *Stemmadenia tomentosa*, und *Voacanga africana* konnte PAWELKA (1985) Tabersonin detektieren. Spektakulär war bei diesen Untersuchungen jedoch die Entdeckung der ersten dimeren Indolalkaloide in Pflanzenzellkulturen. Die Tabersonin-Dimeren Voafrin A und B (Abb. 4) aus der Zellkultur von *Voacanga africana* wurden von STÖCKIGT et al. (1984) strukturell aufgeklärt. Diese Dimere sind bisher aus der differenzierten Pflanze nicht bekannt. Damit war ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Sekundärstoff-Zusammensetzung von Pflanze und Zellkultur, wie auch im Falle von *Rauwolfia serpentina* und *Catharanthus roseus* gegeben.



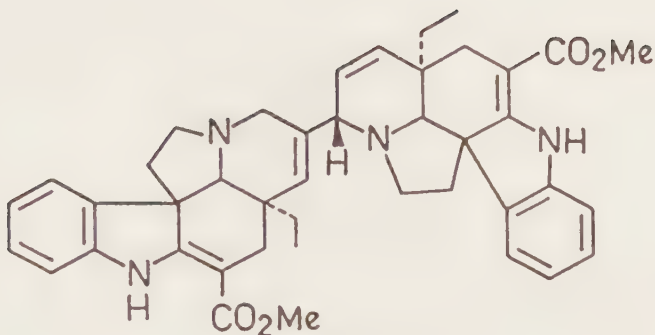
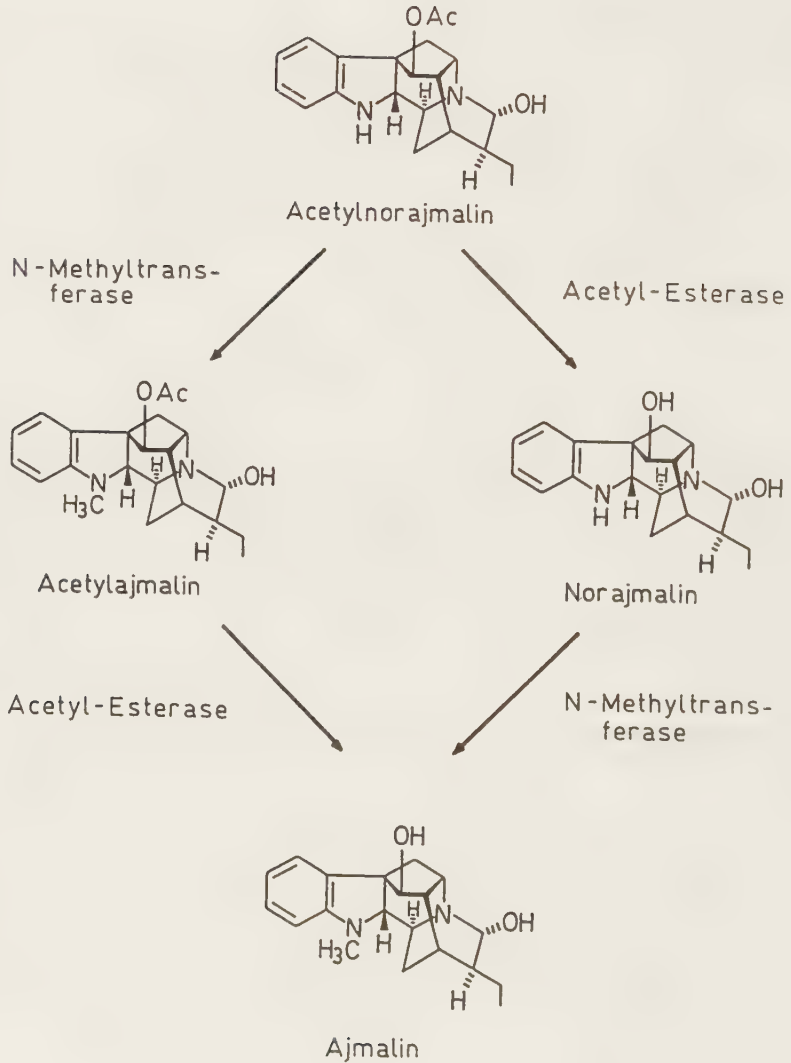


Abb.4b: Voafrin B

Die vorliegende Arbeit widmet sich zwei Endabschnitten der Biosynthese von Indolalkaloiden. Bei der Bildung des Ajmalin sollte die Na-Methylierung des Ajmalan-Skeletts untersucht und so zur Aufklärung der Reaktionssequenz zwischen Acetylnorajmalin und Ajmalin beigetragen werden (Schema 6). Für diese Arbeiten stand die schon von A. PFITZNER überaus erfolgreich eingesetzte Zellsuspensions-Kultur von *Rauwolfia serpentina* zur Verfügung.

Im Gegensatz dazu waren Zellkulturen von *Catharanthus roseus* kein geeignetes Objekt, die letzten Schritte der Vindolin-Biosynthese zu verfolgen. In der entdifferenzierten Zellsuspension ist zwar Tabersonin, aber kein Vindolin aufzufinden. Dies erstaunt umso mehr, als nur relativ wenige Umwandlungen an der Peripherie des Tabersonins zum Vindolin führen (Abb. 5). Zum besseren Verständnis dieser Situation sollten in zellfreien Systemen aus differenzierten *C. roseus* Pflanzen das metabolische Schicksal von Tabersonin und daran beteiligte Enzyme der Vindolin-Biosynthese untersucht werden.



Schema 6: Mögliche Biosynthese-Sequenz zwischen Acetylnorajmalin und Ajmalin

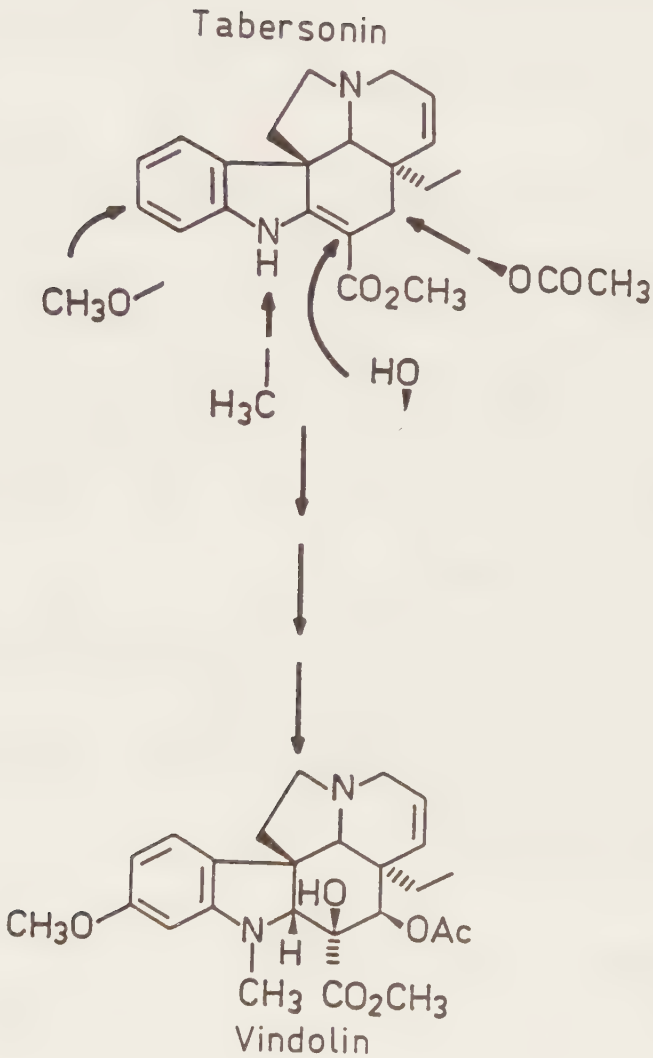


Abbildung 5: Reaktionsschritte zur Umwandlung von Tabersonin in Vindolin

II. Material und Methoden

A. Material

1. Biologisches Material

1.1. Pflanzen

Catharanthus roseus G. Don Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Standardbedingungen, 20-25 °C unter natürlicher Beleuchtung gehalten. Von Mai bis Oktober stand frisches Pflanzenmaterial durch Rückschnitt zur Verfügung. Für die fachgerechte Anzucht und Pflege der Pflanzen danke ich Frau H.Hirschmann und Herrn F.Meyer. Die Blätter wurden unmittelbar nach dem Abstreifen unter flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet. Wurzeln fanden nach Waschen unter fließend kaltem Wasser Verwendung. Fruchtwände konnten nach manuellem Bestäuben der Gewächshauspflanzen von reifen, bei Raumtemperatur getrockneten Früchten gewonnen werden.

1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Zellsuspensionskulturen wurden in Erlenmeyerkolben, die zu einem Viertel ihres Nennvolumens mit Nährmedium gefüllt waren, unter Dauerlicht (600 Lux) bei 22-24 °C mit 100 rpm geschüttelt. Auf neues Medium überimpfte man mit ca. 20% Inokulum in einwöchigem Abstand. Verwendete Medien waren LS (LINSMAIER und SKOOG, 1965) und 4X (GAMBORG et al., 1968, abgeändert nach ULBRICH und ZENK, 1979).

1.3. Mikroorganismen

1.3.1. Pilze

Der Fadenpilz *Sepedonium chrysospermum* ATCC 13378 war von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA erhältlich. Die Anzucht erfolgte auf Kartoffel-Dextrose Agar (Kartoffelaufguß 4,0 g, Glucose 20,0 g, Agar 15,0 g, Aqua dest. ad 1 l) bei 25 °C. Zur Erhaltung wurde der Pilz nach Anwachsen in Schraubgläschen mit Sabouraud-Maltose (Merck) Schrägagar bei 4 °C aufbewahrt. Für Submerskulturen fand GY-Medium (Sojamehl 5,0 g, Glucose 20 g, Hefeextrakt 5,0 g, NaCl

5 g, K_2HPO_4 5 g, Aqua dest. ad 1 l, mit HCl auf pH 7,0 eingestellt), Verwendung. Dazu wurden im Wasserbadschüttler (New Brunswick, Heusenstamm) bei 27 °C Erlenmeyerkolben, die zu einem Fünftel gefüllt waren, mit 200 rpm in Bewegung gehalten.

1.3.2. Bakterien

Die Actinomyceten *Streptomyces albogriseolus* NRRL 5748 und *Streptomyces platensis* NRRL 2364 stammten von der ARS Culture Collection, Peoria, USA. Die Aufbewahrung der Sporen erfolgte als Suspension in 40% Glycerin bei 4 °C. Soja/Mannit Agarplatten (Sojamehl 20,0 g, Mannit 20,0 g, Agar 22,0 g, Aqua font. ad 1 l; pH 6,8) dienten zum Anziehen bei 30 °C. Zur weiteren Erhaltung in Festkultur benutzte man für *S. albogriseolus* GYM-Agarplatten (Glucose 4,0 g, Hefeextrakt 4,0 g, Malzextrakt 10,0 g, $CaCO_3$ 3,0 g, Agar (Merck) 12,0 g, Aqua dest. ad 1 l; pH 7,2) und für *S. platensis* Rz-Medium (H_2SO_4 0,25 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10,12 g, Glucose 10,0 g, Casamino-acids (Difco) 0,1 g, Hefeextrakt 5,0 g, TES 5,73 g, Agar (Bacto) 14,0 g, 1 ml 0,5% KH_2PO_4 -Lösung, 0,4 ml 5 M $CaCl_2$ -Lösung, Aqua dest. ad 1 l; pH 7,6). Flüssigmedien waren CSL-Medium (Glucose 10,0 g, Corn steep liquor (Sigma) 10,0 g, Malzextrakt 5,0 g, Sojamehl 10,0 g, $CaCO_3$ 1,0 g, NaCl 5,0 g, Aqua dest. ad 1 l), DH-Medium ($NaNO_3$ 3,0 g, K_2HPO_4 1,3 g, $MgCO_3 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, $FeSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,01 g, KCl 0,5 g, Dextrin 30,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Aqua dest. ad 1 l), SM-Medium (Sojamehl 20,0 g, Mannit 20,0 g, Aqua font. ad 1 l; pH 6,0) und PNZ-Medium (Galactose 25,0 g, lösliche Stärke 10,0 g, Pepton 40,0 g, NZ-Amine A 4,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5,0 g, $CaCl_2$ 2,0 g, Aqua font. ad 1 l; pH 7,6).

Sämtliche Fest- und Flüssigmedien wurden bei 121 °C/2 bar 20 Minuten autoklaviert.

2. Chemikalien

Hemmstoffe wie Acetylaceton, Dicoumarol, Diethyldithiocarbamat, Iodosobenzoat, Leupeptin, Morin, N-Ethylmaleimid, Neocuproin, Pargylin, p-Hydroxymercuribenzoat, stammten von Sigma (Deisenhofen), 5,5'-Dithiobis-(2-nitro)-benzoat von

Merck (Darmstadt) und 2,2'-Dithiodipyridin, Jodacetamid, Phenanthrolin, Phenylmethylsulfonylfluorid von Serva (Heidelberg).

Deuterierte Lösungsmittel waren von Merck, Sharp und Dohme (München), NaBD₄ von Sigma (Deisenhofen) erhältlich.

Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

Für die Elektrophorese benötigtes Material lieferten Serva (Heidelberg): Acrylamid 2x krist., Ammoniumpersulfat, Anoden- und Kathodenlösungen zur IEF, Bisacrylamid, Coomassie Brilliant Blue G 250, Elektrodenstreifen zur IEF, Glycin, Proteintestmischung zur pI-Bestimmung, Servalyt-Trägerampholyte, Silikongummi-Applikatorstreifen, Temed; Merck (Darmstadt): Bromphenolblau, Natriumdodecylsulfat, n-Decan; LKB (Gräfelfing): Elektrodenpapier zur Elektrophorese, Repel-Silane; Biozym Diagnostic (Hameln): Gelbond-Folie; Sartorius (Göttingen): Celluloseacetat-Filterbögen; Sigma (Deisenhofen): SDS-Markerproteine, Ponceau-S; Boehringer (Mannheim): Tris; Pharmacia (Freiburg): Sephadex G 200 superfine.

Tenside wurden bezogen von Boehringer (Mannheim): CHAPS, Octylglucosid; Serva (Heidelberg): Triton X 100; und Merck (Darmstadt): Natriumdesoxycholat.

Puffersubstanzen und Additive für Proteinextrakte kamen von Merck (Darmstadt): Dithioerythrit, Imidazol p.a., Kaliumphosphat p.a., β -Mercaptoethanol p.a., Tris p.a.; Sigma (Deisenhofen): Tricin; Boehringer (Mannheim): Hepes, Tris.

Mit Biochemikalien versorgten Sigma (Deisenhofen): Acetyl-CoA-Synthetase, Ceruloplasmin, Dimethylpterin, Dihydropteridin-Reduktase, Leberacetonpulver, Meerrettich-Peroxidase, α -Ketoglutarat, alkalische Phosphatase, Propionyl-CoA; und Boehringer (Mannheim): Acetyl-CoA, ATP, FADH₂, FMN, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glucose-Oxidase, Katalase, NAD, NADP, NADPH, S-Adenosylmethionin.

Lieferanten für Chromatographie-Material waren: Merck (Darmstadt): Fraktogel TSK; Pharmacia (Freiburg): Sephadex,

Q-Sepharose FF, Octyl- und Phenylsepharose, Superose, Mono Q; Amicon (Düren): dyematrix screening kit; LKB (Gräfelfing): AcA, TSK G 3000 SW; Sigma (Deisenhofen): Reactive Red 120 = Procion Red H-3B; Boehringer (Mannheim): Coenzym A, Combithek II-Eichproteine; Whatman (USA): DE 52; Serva (Heidelberg): XAD 2.

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel stammten aus den üblichen Quellen und waren von höchstmöglicher Reinheit.

3. Geräte

Zur Proteinreinigung stand eine Chromatographiestation der Firma LKB zur Verfügung, bestehend aus Ultrograd, Uvicord, Multirac, Chopper Bar Recorder und Multiperplex Peristaltic Pump. Die Elektrophoresestation derselben Firma bestand aus dem Macrodrive 5 Power Supply und aus der Multiphor II Kammer, gekühlt von einem Lauda K2R-Thermostaten.

Enzymreaktionen wurden mit einem Eppendorf-Geräteset aus Thermostat 5320, Mixer 5432 und Zentrifuge 5414 durchgeführt.

Für HPLC Trennungen wurde eine Anlage von Spectra Physics mit SP 4100 Computer-Integrator, SP 8440 UV/VIS Detektor, SP 8700 Pumpensteuerung und einem automatischen Probengeber SP 8780XR verwendet.

UV-Spektren wurden in Methanol an einem 551 S UV/VIS Spektralphotometer von Perkin-Elmer gemessen. Infrarot-Spektren wurden von KBr-Preßlingen mit einem Beckman Accu Lab 1 Spektrometer erhalten. Die Bestimmung der optischen Drehung erfolgte mit dem Perkin Elmer Polarimeter 241 in einer 1 ml Küvette.

Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 44 S Massenspektrometer mit Elektronenstoß-Ionisation (70 eV) gemessen. Herrn Prof.B.Danieli (Mailand) sowie Herrn Dr.E.Schröder (Finnigan GmbH, Bremen) danke ich für FAB- und hochauflösende Massenspektren.

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AM 360 Spektrometer bei 360 MHz bzw. 90,56 MHz registriert. Für diese Messungen bin ich Herrn Dr.H.H.Schübel dankbar. Für die Aufnahme von

Spektren auf einem Bruker AM 600 Gerät danke ich Herrn Dr.M.Spraul (Bruker GmbH, Rheinstetten). Die chemischen Verschiebungen (δ) werden in ppm, die Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben.

Radioaktivitätsmessungen wurden an einem Betaszint BF 5000 Szintillationszähler von Berthold in jeweils 5 ml Rotiszint (Roth) durchgeführt. Die Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschicht-Chromatogrammen ermittelte ein Berthold Dünnschichtscanner LB 2722-2.

Die computergestützte Molekülgraphik wurde mit dem Programm SYBYL in der Version 5.05 (Evans and Sutherland, München) erzeugt. Dazu wurde an einer VAX 11/730 der Volkshochschule Hallbergmoos (Landkreis Freising) gearbeitet. Für seine Unterstützung bei der Installierung des Programms bedanke ich mich bei Herrn G.Schünemann (DEC, München). Als Graphikterminal diente ein Personal Computer (FAST 386, CMTE FAST GmbH, München) unter dem Programm NITRO (Evans and Sutherland). Das Programm ALCHEMY (Evans and Sutherland) wurde zum erstmaligen Aufbau der Struktur-Modelle auf einem PC verwendet. Datenaustausch zwischen PC und VAX konnte mit dem Programm KERMIT (Columbia University, USA) durchgeführt werden. Für die leihweise Überlassung ihrer Programme sei der Firma Evans and Sutherland an dieser Stelle gedankt.

B. Methoden

1. Darstellung von Alkaloid-Derivaten

1.1. Acetylierungen mit Acetanhydrid

Nach zwölfstündiger Einwirkung eines Acetylierungsgemisches aus Acetanhydrid/Pyridin 1:1 bei RT wurde das Acetyl-Derivat durch Dünnschichtchromatographie gereinigt.

1.2. Reduktion mit Natriumborhydrid

Die Reduktionen erfolgten in methanolischer Lösung mit einem Überschuß NaBH_4 . Nach 2-14 Stunden wurden die Ansätze mit Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8 neutralisiert. Zur Entfernung des Methanols engte man das Gemisch ein, bevor mit Dichlormethan

extrahiert wurde. Die Reaktionsprodukte waren durch chromatographische Reinigung erhältlich.

1.3. Enzymatische Deacetylierung von Vinblastin

Die milden Bedingungen einer enzymatischen Umsetzung *in vitro* sind gerade bei Alkaloiden mit vielen unterschiedlichen funktionellen Gruppen und chiralen Zentren von Vorteil. Neben der Möglichkeit, die hochspezifischen Enzyme, die an der Biogenese selbst beteiligt sind, für selektive Änderungen einzusetzen (II.B.1.5.), lassen sich empirisch auch unspezifische Enzymsysteme nutzen. So zeigen Leberpräparationen von Säugetieren Einsatzmöglichkeiten für vorhersehbare Modifikationen und für *in vitro* Metabolismusstudien (HOLLAND 1981). Carboxyl-Esterhydrolasen, wie die verwendete Schweineleber-Esterase EC 3.1.1.1., sind allgemein von geringer Substratspezifität (KRISCH 1971). Vinblastin besitzt neben der Acetylgruppe noch zwei verseifbare Methylester-Gruppierungen. Die Schweineleber-Esterase setzt jedoch, wie gewünscht, nur die Acetylgruppe frei: 6 mg Vinblastinsulfat (6,6 μmol) und 0,5 ml Schweineleberesterase-Suspension (11 μkat , bezogen auf Buttersäure-Ethylester) wurden in 5 ml 50 mM Borat-Puffer pH 8,0 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend extrahierte man den Ansatz mit Dichlormethan. Aus dem Dünnschicht-Chromatogramm (LM A) ließ sich vollständiger Umsatz zu Deacetylvinblastin ermitteln, von dem 4,2 mg (83%) isoliert werden konnten.

N- und O-Demethylderivate von Vindolin oder Vindorosin wurden von der Esterase nicht umgesetzt.

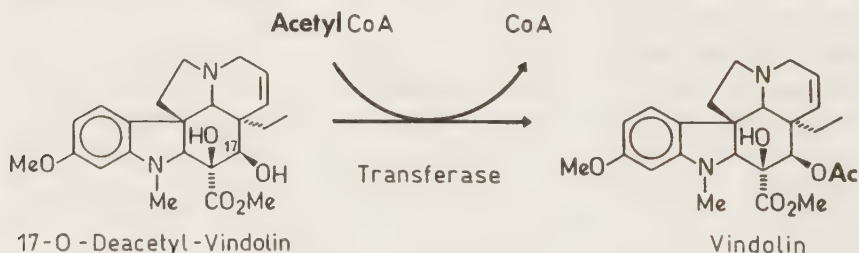
1.4. Alkalische Deacetylierung von Vincristin

Für diese besonders teure Substanz durfte keine Adsorption an Protein durch eine Formylgruppierung, wie am Beispiel des Perakin (SCHÜBEL 1986) gezeigt, riskiert werden. Deshalb wurde anstatt einer Esterase-Spaltung (II.B.1.3.) die Acetylester-Gruppierung mit Natriummethylat in absolutem Methanol bei Raumtemperatur verseift. 5 mg Vincristinsulfat (5,4 μmol) reagierten in 0,5 ml Methanol mit 20 μl Natriummethylat-Lösung (0,3 g Natrium in 10 ml Methanol) 24 Stunden lang.

Anschließend versetzte man das Gemisch mit 1 ml Borat-Puffer 1 M pH 8,0. Zur Entfernung von Methanol wurde auf 0,5 ml eingeeengt und dann mit Dichlormethan extrahiert. Dünnschichtchromatographisch (LM A) wurden 3,3 mg Deacetyl-Vincristin in 78% Ausbeute zurückgewonnen.

1.5. Enzymatische Synthese von ^3H - und ^{14}C -Acetyl-markiertem Vindolin

Um eine enzymatische Abspaltung der 17-O-Acetylgruppe des Vindolin verfolgen zu können, wurde eine Markierung an dieser Position eingeführt. Eben das Enzym, das diese Gruppierung in der Biogenese einführt (II.B.5.), war für diese *in vitro* Synthese verfügbar (Schema 7):



Schema 7: Enzymatische Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin

In 5 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 8,0) wurden 2,4 μmol Deacetylvindolin, 130 nmol ^3H -markiertes AcetylCoA (5,7 kBq/nmol) und 8 nkat (0,5 nkat/mg Protein) Acetyltransferase 75 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Boratpuffer (1 M, pH 8,6) schüttelte man 3 mal gegen 10 ml Dichlormethan aus. Nach chromatographischer Reinigung im LM D konnten 388 kBq (68 nmol) ^3H -Acetyl-Vindolin in 52% Ausbeute erhalten werden.

^{14}C -Acetyl-markiertes Vindolin war über ^{14}C -Natriumacetat zugänglich. 0,5 μmol Natriumacetat (2,18 kBq/nmol), 9 μmol ATP, 33 μmol MgCl_2 , 0,7 μmol Coenzym A und 8,5 nkat AcetylCoA-Synthetase in 3 ml 0,1 M Tris HCl Puffer pH 8,0 (RT) wurden 30 Minuten bei 37 °C temperiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1,3 nkat Acetyltransferase (1,2 nkat/mg Protein) in 3 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 8,0) und von 2,4 μmol

Deacetylvindolin in 100 µl Aceton. Nach weiteren 90 Minuten arbeitete man das Reaktionsgemisch, wie für den ^3H -AcetylCoA-Ansatz beschrieben, auf. Isoliert wurden 187 kBq (85 nmol) ^{14}C -Vindolin, was einer Ausbeute von 16% entspricht.

Zu beachten war, daß bei weniger gereinigten Proteinfractionen als den eingesetzten, noch eine Verunreinigung durch endogenes Vindolin vorliegen konnte.

Diese enzymatische Methode erlaubt die Herstellung hochmarkierten Vindolins, wie es als Tracersubstanz bei Radioimmuno-Assays für Vindolin (KUTNEY et al., 1980 b; WESTEKEMPER und Mitarbeiter; 1980, LAPINJOKI et al., 1987) benötigt wird.

1.6. Mikrobielle Transformation von Alkaloiden

Die Fähigkeit von Mikroorganismen, zugesetzte Fremdstoffe zu metabolisieren, wurde erstmals mit der Hydroxylierung des Steroidgerüsts in Stellung 11 (PETERSON und MURRAY, 1952) präparativ nutzbar gemacht. Erschöpfen sich solche Transformationen in der Derivatisierung des Ausgangsproduktes und führen nicht zum vollständigem Abbau, sind diese Mikroorganismen als spezifische Katalysatoren aufzufassen (PECZYNSKA-CZOCH und MORDARSKI, 1983). Dabei gelten für diese *in vivo* Umsetzungen die Gesetzmäßigkeiten der Enzymkatalyse; so sind sie regioselektiv, stereospezifisch, laufen, was pH-Werte, Temperaturen, Lösungsmittel, betrifft, unter physiologisch milden Bedingungen ab und benötigen keine vorherige Aktivierung des umzusetzenden Moleküls (DAVIS, 1984).

Vergleichbar mit allgemeinen Entgiftungsvorgängen treten Hydrolysen und Oxidationen bevorzugt auf (HOLLAND, 1981). Die Umsatzrate ist mit der Lipophilie dieser Fremdstoffe korreliert, was aber durch Löslichkeitsprobleme im wässrigen Milieu eingeschränkt wird (GIBSON et al., 1984). Die gezielte Anwendung dieser Methode wird durch Auslese von Mikroorganismen hinsichtlich bestimmter Reaktionstypen an verschiedenen Molekülen oder spezieller Reaktionsorte an gleichen Substraten ermöglicht (KIESLICH, 1976). Einsatz

finden solche Biokonversionen, wo sie Enantiomeren-Reinheit durch stereoselektiven Auf- oder Abbau ermöglichen (DAVIS et al., 1984). Auch wird so der Zugang zu anders nicht zu erhaltenden Derivaten von labilen, polyfunktionellen oder stereochemisch kompliziert aufgebauten Strukturen eröffnet, die z.B. durch ihre Reaktivität als Synthone dienen können (WU et al., 1978; GUSTAFSON und ROSAZZA, 1979). Biopharmazeutisch ist die Verwendung als Modellsystem für den Arzneistoff-Metabolismus im Säugetier von besonderem Interesse (ROSAZZA und SMITH, 1974). Vorteilhaft ist hier die gegenüber dem Tiermodell erleichterte Handhabung und Variation. Die Möglichkeit, Spurenmetabolite zu akkumulieren, läßt die strukturelle Aufklärung, gezielte Suche und pharmakologische Beurteilung sonst übersehener Abbauprodukte zu.

Obwohl Alkaloide wegen komplexer, heterozyklischer Struktur schwerer als andere Stoffklassen mikrobiell zu derivatisieren sind (KIESLICH, 1976), gibt es doch eine Reihe von Beispielen gerade für Rauwolfia- und Catharanthus-Alkaloide (HOLLAND, 1981; DAVIS, 1984). Für die gezielte Synthese von Substraten für den *in vitro* Test spezifischer Pflanzenenzyme wurde auf solche publizierten Arbeiten zurückgegriffen.

2. Herstellung von Chromatographie-Medien

2.1. Kopplung eines Triazin-Farbstoffes zur Affinitäts-chromatographie

Für die Chromatographie an Farbstoffssäulen ist neben Eigenschaften von Matrix und Farbstoff auch die Konzentration des immobilisierten Farbstoffes für Adsorptionsverhalten und -bedingungen ausschlaggebend (SCOPES, 1983). Zur Reinigung der 17-O-Deacetylvindolin-Acetyltransferase wurde nach Vorversuchen mit dem dye-matrix screening kit der Firma Amicon, das die von FULTON und CARLSON 1980 beschriebenen Chromatographie-Gele enthält, der Farbstoff Procion Red H-3B ausgewählt. An die benutzte Matrix, Fraktogel TSK HW 65 F, war eine möglichst hohe Farbstoffmenge zu koppeln, um Verluste an Enzymaktivität im Durchlauf gering zu halten. Für dieses Gelmaterial war von

GUNZER und HENNRICH (1984) die Immobilisierung nach RINDERKNECHT et al. (1967) vorgeschlagen. Diese Methode erbrachte aber einen visuell erkennbar wesentlich geringeren Substitutionsgrad als die Reaktionsbedingungen von ATKINSON et al. (1981), die nach LOWE und PEARSON (1984) modifiziert wurden:

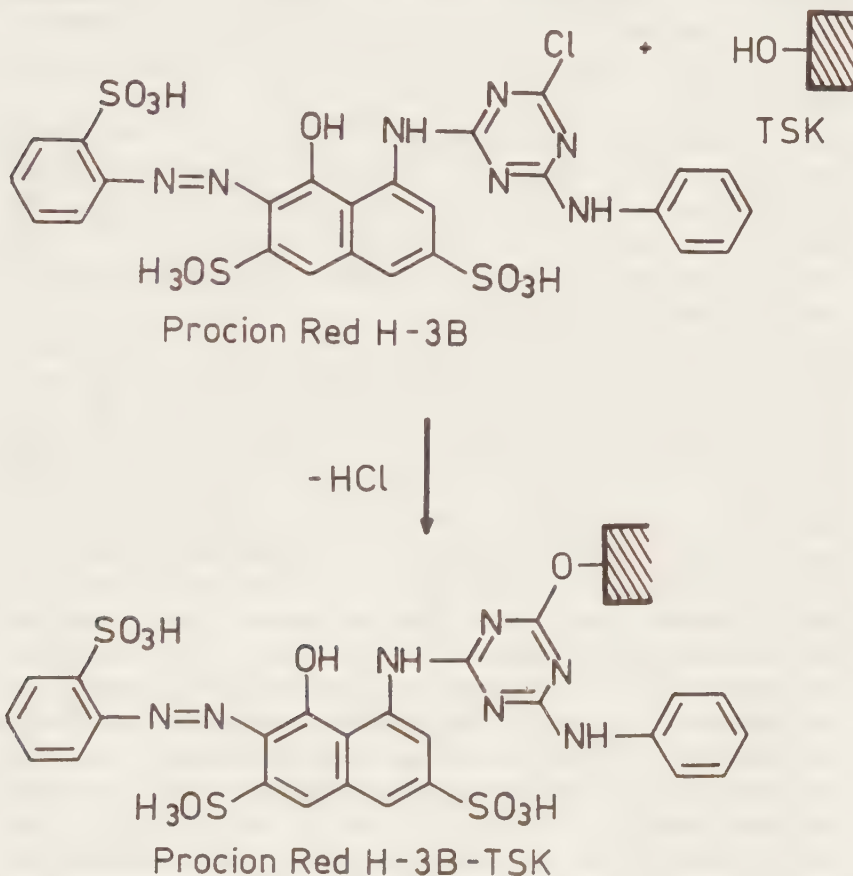


Abb. 6: Kopplung von Procion Red H-3B an Fraktogel TSK HW 65 F
 100 ml abfiltriertes Gelbett Fraktogel TSK HW 65 F wurden mit
 180 ml Wasser, 1,2 g Procion Red H-3B in 80 ml Wasser, 40 ml
 4 M NaCl-Lösung, 4 ml 10 N Natronlauge und 0,5 ml Pyridin 72

Stunden lang bei Raumtemperatur mit einem Glasstabrührer in Suspension gehalten. Nach Vakuumfiltration wusch man mit je 300 ml Wasser, 1 M NaCl in 25% Ethanol, Wasser, 1 M NaCl in 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 und wiederum mit Wasser nach. Anschließend wurde die Färbung nochmals unter denselben Bedingungen wiederholt. Die Abbildung 6 zeigt die Kopplungsreaktion, wie sie mit dem Triazinfarbstoff stattfand.

2.2. Epoxid-Aktivierung mit Epichlorhydrin zur Immobilisierung von Liganden.

Mit eingeführten Epoxidgruppen aktivierte Gelmaterialien lassen sich vielseitig für die Affinitätschromatographie nutzen. Liganden können direkt durch nukleophile Addition oder nach weiterer Derivatisierung gekoppelt werden. Für das zweite Verfahren eignen sich besonders nach Reaktion mit Ammoniak resultierende freie Aminogruppen.

Nach der Anleitung von MATSUMOTO und Mitarbeitern (1982) wurde Fraktogel TSK HW 65 S mit Epichlorhydrin umgesetzt. Zu 50 ml abfiltriertem Gel gab man 50 ml 10 N Natronlauge und 75 ml Epichlorhydrin. Im Wasserbad wurde für 5 Stunden mit einem gebogenem Glasstab bei 30 °C umgerührt. Zur Beendigung der Reaktion wusch man das abfiltrierte Gel mit 500 ml Wasser nach. Unverbrauchtes Epichlorhydrin im Waschwasser konnte mit Natriumthiosulfat entsorgt werden. In das Gel eingeführte aktive Epoxidgruppen wurden über Aminierung, ebenfalls nach der Vorschrift von MATSUMOTO et al. (1982), bestimmt. Mit demselben Volumen Ammoniaklösung 25% versetzt, rührte das Gelmaterial 2 Stunden bei 40 °C um. Anschließend wurde, wie bei INMAN (1983) beschrieben, der Gehalt an Aminogruppen durch Titration des gewaschenen und neutralisierten Gels mit Salzsäure ermittelt. Der Wert von ca. 90 µmol/ml Gelbett entsprach der Angabe von MATSUMOTO et al. (1982), so daß etwa 150 µmol/ml an Epoxidgruppen in der Chromatographie-Matrix vorhanden waren. In Abbildung 7 ist diese Aktivierung zu erkennen.

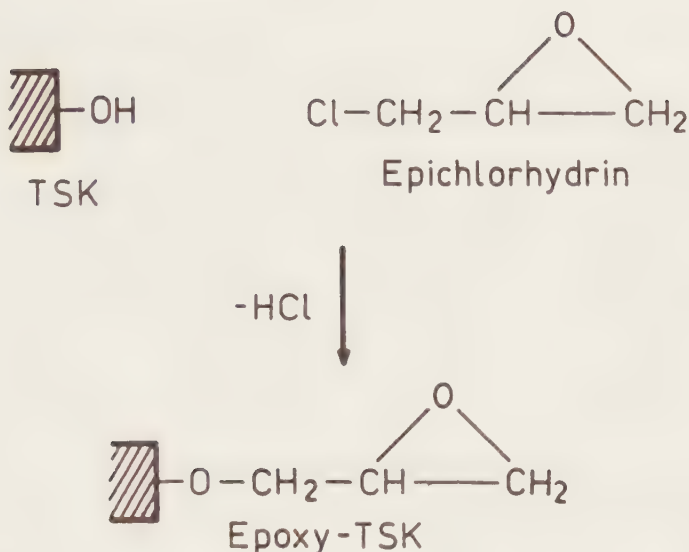


Abb. 7: Epoxid-Aktivierung von Fraktogel TSK HW 65 S

Aus Carbodiimid-Kopplung von Alkaloid-Säuren an aminiertes Gel resultierten keine brauchbaren Affinitäts-Medien.

2.3. Immobilisierung von Coenzym A an epoxidaktiviertes Fraktogel TSK HW 65 S

Zu 10 ml aktiviertem Gel in 10 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 wurden 50 mg (61 μ mol) Coenzym A gegeben. Die Suspension hielt man 24 Stunden mit einem Glasstabrührer bei 30 °C in Bewegung. Mit demselben Puffer wurde das abfiltrierte Gelmaterial nachgewaschen und im Filtrat ungebundenes CoA photometrisch bestimmt ($\epsilon_{260} = 4,20$). Unter diesen Bedingungen waren 15 μ mol Coenzym A immobilisiert worden. Überschüssige freie Epoxidgruppen ließ man während 8 Stunden in 1 M Ethanolamin-Lösung absättigen. Abbildung 8 demonstriert die Kopplung des Coenzym A über eine Thioether-Bindung. Diese stabile Bindung verlieh der Affinitäts-Säule, aufbewahrt in 0,02% NaN_3 -Lösung, über 2 Jahre lang unveränderte Trenneigenschaften.

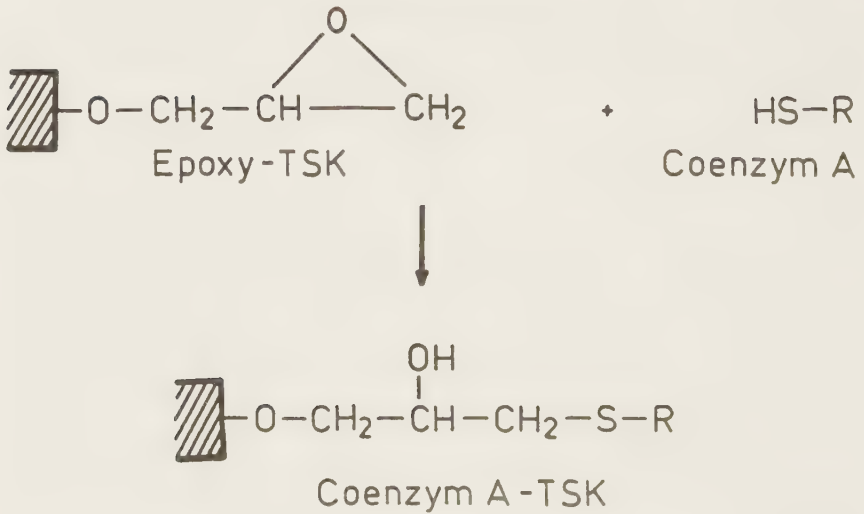
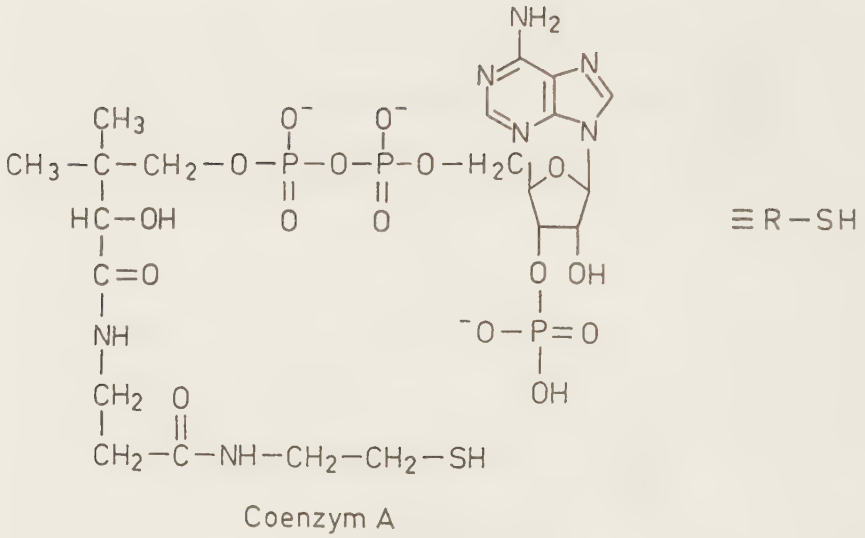


Abb. 8: Immobilisierung von Coenzym A

2.4. Kopplung von Phenol an epoxidaktiviertes Gel zur hydrophoben Chromatographie

Für die hydrophobe Chromatographie der Deacetylvindolin-Acetyltransferase wurde ein Medium mit Bindungseigenschaften benötigt, die stärker als bei Phenylsepharose, jedoch schwächer als bei Octylsepharose sein sollten. Als Matrix bot sich Fraktogel an, das deutlich hydrophober als Sepharose ist und auch unsubstituiert für die hydrophobe Adsorption von Proteinen genutzt werden kann (SAKIHAMA *et al.*, 1983). Neben den van der Waals-Wechselwirkungen der Matrix mit aliphatischen Aminosäuren lieferte die Substitution mit Phenylresten und deren Bindung aromatischer Aminosäuren ein für das Trennproblem geeignetes Medium.

Zu 30 ml epoxidaktiviertem Fraktogel TSK HW 65 S in 50 ml 0,2 N ethanolischer Kalilauge wurden 2 g Phenol gegeben und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Waschen mit Ethanol konnten noch intakte Epoxidgruppen mit 1 M Ethanolamin blockiert werden.

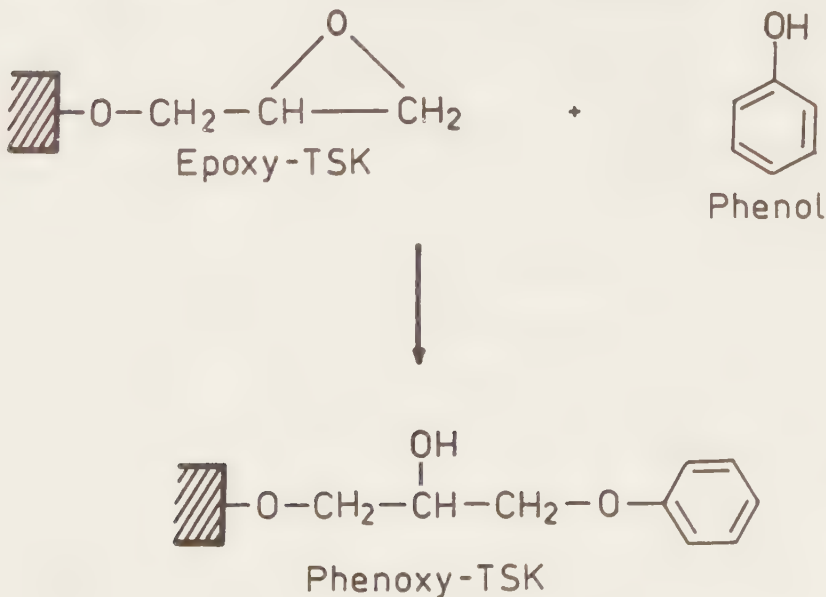


Abb. 9: Immobilisierung von Phenol

Das Gel zeigte niedrigen Flußwiderstand, keine Volumenänderung bei verschiedenen Salzkonzentrationen und hat sich auch bei anderen Proteinreinigungen (POLZ et al., 1987) durch hohe Trennleistung bewährt. Abb. 9 verdeutlicht die durchgeführte Phenyladdition.

3. Chromatographische Verfahren zur Alkaloid-Trennung

3.1. Dünnschichtchromatographie

Die Substanztrennung erfolgte auf Kieselgel DC-Fertigplatten Sil G/UV₂₅₄ der Fa. Macherey und Nagel. Die Entwicklung der Chromatogramme wurde in folgenden Laufmittelsystemen (LM) ohne Kammerfüllung vorgenommen:

LM A	Petrolether/Aceton/Diethylamin	=	7/ 2/ 1
LM B	Ether/n-Hexan	=	1/ 1
LM C	Ether/n-Hexan/Methanol	=	25/25/ 1
LM D	Ethylacetat/Ether/Methanol	=	2/ 2/ 1
LM E	Ethylacetat/2-Propanol/Ammoniak	=	15/ 4/ 1
LM F	Aceton/n-Butanol/Wasser/Eisessig	=	7/ 7/ 4/ 2
LM G	n-Hexan/Ethylacetat/2-Propanol/ Ammoniak	=	10/ 7/ 2/ 1
LM H	Ether/n-Hexan/Methanol/Diethyl- amin	=	45/45/ 2/ 2
LM I	Ether/n-Hexan	=	3/ 2
LM J	Chloroform/Methanol	=	99/ 1
LM K	Chloroform/Methanol	=	19/ 1
LM L	Chloroform/Methanol/Ammoniak	=	95/ 5/0,1
LM M	Ether/n-Hexan/Methanol/Diethyl- amin	=	40/40/ 5/0,1

Die Alkaloide wurden mit Sprühreagenz aus Ammonium-Cer(IV)-sulfat, zu 5% in konzentrierter Phosphorsäure gelöst, detektiert. Dabei ergeben sich charakteristische Farbreaktionen. Für Catharanthus-Alkaloide sind diese bei FARNSWORTH et al. (1964) und für Rauwolfia-Alkaloide bei COURT und IWU (1980) beschrieben.

3.2. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie

Diese leistungsfähige instrumentelle Methode fand Anwendung, um den enzymatischen Umsatz von Tabersonin quantitativ zu erfassen.



Abb. 10: HPLC-Auftrennung der Alkaloide aus Tabersonin-Umsetzung (A) und Kontrolle mit hitzedenaturiertem Protein (B)

Als Trennsystem wurde eingesetzt:

Gerät: Spectra Physics SP 87000
Säule: Select B, RP 18 (Merck)
Fließmittel: Acetonitril/Methanol/Wasser (1% Phosphorsäure)
Gradient: 17/10/73 → 38/10/52 (15 min) → 8/1/1 (5 min) →
8/1/1 (5 min)
Flußrate: 1 ml/min
Detektion: 328 nm.

Unter diesen Bedingungen wurde für Tabersonin eine Retentionszeit von 12 Minuten ermittelt. Voafrin A und B, Hydroxyvoafrin A und B sowie das Tabersonylvoafrin B (Hydroxy- und auch reduzierte Form) trennten sich dabei nicht auf (R_f: 24 min). Bei einer Retentionszeit von 10 Minuten ließ sich jedoch ein Produkt registrieren, das keines der dünn-schicht-chromatographisch aus der Enzyminkubation zu erhaltenden Verbindungen darstellte. Als Maß für die Enzym-Aktivität wurde deshalb die Abnahme von Tabersonin gemessen. Abbildung 10 zeigt das Elutionsprofil dieser Trennung.

4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Rohextrakten aus Zellkulturen und Pflanzen wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt. Als Standard zum Aufstellen einer Eichgeraden diente Rinder Serum-Albumin. Zur Messung von tensidhaltigen Proteinlösungen wurde diese Kalibrierung mit entsprechender Tensidkonzentration vorgenommen. Zur Berechnung von Enzym-Anreicherungen diente eine nach APPENROTH und AUGSTEN (1987) modifizierte Variante dieser Bestimmungsmethode. Durch Zugabe von SDS wurde die Proteinmessung von der Probenzusammensetzung unabhängiger. Daraus resultierte eine genauere Messung, ohne Beeinflussung durch hydrophobe Eigenschaften der Proteine. In den durchgeführten Reinigungs-Gängen resultierte so eine geringere Anreicherung als wenn nach BRADFORD bestimmt worden wäre.

5. Elektrophoretische Methoden

5.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach DAVIS (1964) wandern Proteine in nativem Zustand im elektrischen Feld, abhängig von ihrer Nettoladung beim vorliegenden pH und von dem erfahrenen Widerstand. Dieser hängt von der Größe des Proteins und der Maschenweite des Gels ab. Für die beabsichtigte Auftrennung wurde diese Porengröße durch 9,7% Acrylamid und 0,3% Bisacrylamid-Konzentration (10% T, 3% C) bei der Polymerisation geeignet festgelegt. Der Vorteil der Diskelektrophorese besteht zudem in einer Aufkonzentrierung der Proteinbanden beim Übertritt vom Sammel- ins Trenngel.

Durchgeführt wurde die Elektrophorese im horizontalen, ultradünnen Gel, das auf eine Acrylamid-behandelte Trägerfolie aufpolymerisiert wird (GÖRG et al., 1986). Die Geldimensionen waren 0,36 x 195 x 250 mm. Daraus ergab sich bei einer Länge des Sammelgels von 3 cm eine Trenndistanz von 14 cm, der 20 Proben gleichzeitig unterworfen werden konnten. Das Sammelgel bestand aus Acrylamid/Bisacrylamid in einer Konzentration von 4% T, 3% C, 0,5 M Tris·HCl-Puffer pH 6,8 und 40% Glycerin. Das Trenngel setzte sich aus 10% T, 3% C und 1,5 M Tris·HCl, gepuffert bei pH 8,8, zusammen. Katalysiert durch Ammoniumpersulfat und Temed, war das Gel nach 60 Minuten bei 50 °C auspolymerisiert. Eine 0,375 M Tris/Glycin-Lösung mit pH 8,3 stellte den Elektrodenpuffer dar. Die Proben waren in je 10 µl 50 mM Tris·HCl-Puffer pH 6,8, 4 mM DTE mit 0,01% Bromphenolblau gelöst. Zur Orientierung über die Auftrennung wurde ein Gemisch Eichproteine für die Gelfiltrations-Chromatographie der Fa. Boehringer aufgegeben. Den elektrophoretischen Lauf führte man bei 4 °C mit 1200 V, 50 mA und 30 W als begrenzende Werte in ca. 2 Stunden durch. Er wurde gestoppt, nachdem die Bromphenolblau-Front die Anodenbrücke erreicht hatte.

5.2. SDS-Disk-Elektrophorese

Bei der SDS-Diskelektrophorese nach LAEMMLI (1970) wird durch Beladen der Proteine mit Natriumdodecylsulfat eine einheitliche negative Überschußladung erzeugt. Die elektrophoretische Laufstrecke des SDS-Proteins ist nun nurmehr mit dessen Größe korreliert; durch die Denaturierung entspricht diese jedoch nicht der eines nativen Proteins mit gleichem Stoke'schen Radius.

Zur Erzielung optimaler Bandenschärfe wurde neben der Diskontinuität zwischen Sammel- und Trenngel auch der Konzentrierungseffekt eines Porengradienten genutzt. Ein solcher Gradient erlaubt zudem die Trennung von sehr heterogen Proteingemischen ohne Verlust an Auflösung.

Das Ultradünnschicht-Gradientengel wurde in den Dimensionen 0,36 x 195 x 250 cm nach der Vorschrift von WESTERMEIER (1985) gegossen. Ein linearer Verlauf von 8% T, 3% C bis 25% T, 3% C erwies sich für die Auftrennung der anfallenden Pflanzenprotein-Proben als besonders geeignet. Dieser Gradient wurde während der Polymerisation durch 30 - 0% Glycerin stabilisiert. Unterschichtet war das Trenngel in der Küvette mit Sammelgel aus 4% T, 3% C und 40% Glycerin. Die Polymerisation wurde mit Ammoniumpersulfat und Temed eingeleitet und vollzog sich bei 50 °C in einer Stunde. Das Sammelgel war durch 0,5 M Tris·HCl bei pH 6,8, das Trenngel mit 1,5 M Tris·HCl bei pH 8,8 gepuffert. Ebenso wie die Gelpuffer enthielt der Elektrodenpuffer (0,375 M Tris/Glycin pH 8,3) 0,1% SDS. Im Probenpuffer wurden die 20 Proben eines Laufes mit 50 mM Tris·HCl pH 6,8, 4 mM DTE, 0,01% Bromphenolblau und 1% SDS zur vollständigen Denaturierung 5 Minuten gekocht. Bei 4 °C temperiert, wurde das Gel mit maximal 1200 V, 50 mA oder 30 W belastet. Nach ca. 2,5 Stunden konnte der Lauf abgebrochen werden, nachdem das dem Proben zugegebene Bromphenolblau noch 15 Minuten unter die Anodenbrücke gelaufen war. Zur Kalibrierung der relativen Laufstrecken wurde ein Gemisch aus Markerproteinen der Fa. Sigma (SDS-7) mit aufgetrennt.

5.3. Proteinfärbung in Polyacrylamid-Dünnschichtgelen

Um den Vorteil der erhöhten Nachweisempfindlichkeit von Proteinbanden in den Dünnschichtgelen noch zu steigern, wurde eine Silberfärbung Coomassie-vorgefärbter Gele durchgeführt (nach HEUKESHOVEN und DERNICK, 1983). Die Träger-gebundenen Gele nahm man nach Elektrophorese oder Fokussierung vom Kühlblock und fixierte sofort in 20% Trichloressigsäure. Nach Abspülen mit Entfärbelösung (35% Methanol, 10% Essigsäure) wurden sie 30 Minuten in Färbelösung aus 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% Methanol und 10% Essigsäure bewegt. Durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung wusch man das Gel, bis der Hintergrund vollständig geklärt war. Für die anschließende Silberfärbung wurde mit 10% Ethanol und dann mit Wasser nachgewaschen. Nach 30 Minuten Bewegung im 0,1% Silbernitrat-Bad entwickelte das Gel 10 Minuten in 3% Na_2CO_3 Lösung mit 0,02% Formalin. Die Silber-Reduktion wurde in 1% Essigsäure gestoppt. Nach Auswaschen der Essigsäure fand ein Recycling-Schritt statt, der zu intensiver gefärbten Banden vor hellerem Hintergrund führte. Das Silberbild wurde mit Farmer'schem Abschwächer (1% Kaliumhexacyanoferrat III, 1,2% Natriumthiosulfat) vollständig ausgebleicht, bis nur noch die Coomassie-Färbung erhalten blieb. Nach Wässerung mit Leitungswasser wurde mit demineralisiertem Wasser nachgewaschen, bis das Gel nicht mehr gelb gefärbt war. Die folgende Silberfärbung verlief wie der erste Zyklus, jedoch entwickelte man diesmal nach Sicht nur solange, bis eben auch der Hintergrund zu dunkeln begann. Nach Auswaschen des Essigsäure-Stoppbades wurde das Gel in Imprägnierlösung aus 70% Methanol und 3% Glycerin eingelegt. So konnte es in Einmach-Cellophan eingeschlagen und bei Raumtemperatur getrocknet werden. Nach drei Tagen wurde das Gel am Cellophan anhaftend von der Trägerfolie abgezogen und war so archivierbar.

5.4. Trägerampholyt-isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel

Bei der isoelektrischen Fokussierung wandern Proteine im nativen Zustand in einem pH-Gradienten entsprechend ihrer aktuellen Nettoladung im elektrischen Feld; erreichen sie ihren isoelektrischen Punkt, fokussieren sie dort als scharfe Bande, da über- und unterhalb dieser Bande die Laufrichtung entgegengesetzt ist (SVENNENSON, 1961). Bei der Trägerampholyt-Fokussierung wird mit niedermolekularen Polyaminsäuren und Diaminocarbonsäuren, die selbst am Ort ihrer höchsten Pufferkapazität fokussieren, der pH-Gradient erzeugt. Im dünnen horizontalen Gel auf Polyester-Trägerfolie sind durch die effektive Kühlung hohe, für die Trennleistung wesentliche Feldstärken zu erzielen (RADOLA, 1980).

Da mit käuflichen vorgefertigten Gelen (Serva Precotes) keine zufriedenstellende Auflösung erreichbar war, wurden Gele mit Glycerin und Oxidationsschutz angefertigt. Auf eine Trägerfolie polymerisierte ein Gel mit 5% T, 3% C Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration, gestartet mit Ammoniumpersulfat und Temed, in den Abmessungen 120 x 250 x 0,25 mm. Das Gel wurde nach 60 Minuten der Gießkuvette entnommen und zweimal mit je 3 l Wasser eine Stunde gewaschen. Nach zwölfstündigem Trocknen bei Raumtemperatur rehydratisierte man das Polyacrylamid-Gel mit 4% Trägerampholyten (Servalyte 4-6) und 15% Glycerin in 5 mM DTE-Lösung. Nach 3 Stunden hatte das wieder in die Kuvette eingespannte Gel seine ursprüngliche Dicke erreicht. Durch dieses Vorgehen wurde eine Elektroendosmose weitgehend verringert und Oxidationsschutz in einer Konzentration ermöglicht, bei der keine Polymerisation mehr erfolgt wäre. Die Proben wurden mit Silikongummi-Applikatorstreifen aufgebracht, die Elektrodenstreifen an der Anode mit Pufferlösung (Serva) pH 3, an der Kathode von pH 10 durchgefeuchtet. Fokussierungsbedingungen waren bei 10 °C Begrenzung auf 2,5 kV, 30 mA und 7 W. Nach ca. 3 Stunden war das Gel bei 2,5 kV 15 Minuten ohne Stromabfall ausfokussiert. Für die Bestimmung von isoelektrischen Punkten wurden Protein-Testgemische der Fa. Serva verwendet.

5.5. Isoelektrische Fokussierung mit immobilisiertem pH-Gradienten

Bei dieser Methode werden Puffersubstanzen (Immobiline, LKB), die den zur Fokussierung notwendigen pH-Gradienten erzeugen, bereits in das Polyacrylamid-Gel einpolymerisiert. Dieser von Anfang an festgelegte pH-Verlauf unterliegt somit keinen Gefährdungen von Trägerampholyt-Gelen wie Kathodendrift, Verzerrung durch salzbeladene Proben, Leitfähigkeits-Inkontinuitäten. Daraus resultiert eine um eine Größenordnung erhöhte Auflösung von pI-Unterschieden verglichen mit der Trägerampholyt-Technik (BJELLQVIST et al., 1982).

Voraussetzung hierfür ist allerdings ein entsprechend flacher Gradientenverlauf. Ein Fertiggel (Immobiline DryPlate, LKB) von dem pI-Bereich 4,0-7,0 mit 25% Glycerin und 5 mM DTE rehydratisiert erwies sich in der Auftrennung gegenüber dem Trägerampholytgel (II.B.5.4.) nur als ebenbürtig. Das in der benötigten Breite zurechtgeschnittene Gel war gebrauchsfertig 0,5 mm dick und 10,5 cm lang. Es wurde in richtiger Orientierung in die Elektrophorese-Kammer gelegt und mit wassergetränkten Elektrodenstreifen über Nacht bei 10 °C mit Grenzwerten von 5 kV, 25 mA und 7 W fokussiert. Die Proben waren wie bei II.B.5.4. appliziert worden. Abweichend von allen sonstigen Polyacrylamid-Gelen wurde nur mit Coomassie gefärbt, da bei Silberfärbung die einpolymerisierten Immobiline einen stark dunklen Hintergrund verursachten. Neben direktem Ausmessen des Gels dienten zur weiteren Orientierung im pH-Gradienten pI-Markerproteine (Serva).

5.6. Präparative Trägerampholyt-isoelektrische Fokussierung im granuliertem Gel

Als hochauflösende präparative Methode, deren Trennprinzip Unterschiede in dem pI-Werten der vorliegenden Proteine zugrunde liegt, konkurriert die isoelektrische Fokussierung mit der Chromatofokussierung, eingeführt von SLUYTERMAN und ELGERSMA (1978). Verglichen mit der Chromatofokussierung, ist das Protein während der isoelektrischen Fokussierung ungleich länger ohne Eingriffsmöglichkeit pH-Werten um seinen pI ausgesetzt. So ist eine stabile biologische Aktivität des

Proteins in diesem Bereich das Entscheidungskriterium. Ist diese aber gegeben, erreicht man vergleichbare Trennungen mit der isoelektrischen Fokussierung wesentlich ökonomischer.

Wie bei FREY und RADOLA (1982) beschrieben, wurde auf eine Glasplatte 5 x 20 x 0,1 cm ein 1 mm dickes Gel aus Sephadex G 200 mit 4% w/v Trägerampholyten (500 µl Servalyte 4-6, 100 µl Servalyte 4-9T auf 10 ml Gel) und DTE in 4 mM Konzentration gegossen. An den Stirnseiten der Platte trug man einen entsprechenden Gelstreifen ab und legte Elektroden-
dochte, jeweils mit Kathodenlösung (Serva) pH 10 und Anodenlösung pH 3 getränkt, bündig zum Gel auf. 5 cm unter dem Kathodenstreifen wurde die Probe zwischen in das Gel gestanzte Rillen appliziert und die Oberfläche wieder ausgeglichen. Unter Kühlung auf 4 °C fokussierte das Gel mit 400 V 12 Stunden vor. Hatte sich so der pH-Gradient von 4-6 über 20 cm ausgebildet, wurde 1 Stunde auf 1000 V, 1 Stunde auf 1500 V und schließlich 100 Minuten auf 2 kV/15 mA/5 W begrenzt und so mit insgesamt 12.000 Vh ausfokussiert. Um das Gel direkt nach Banden fraktionieren zu können, fertigte man einen Abdruck des Geles auf Celluloseacetat-Filterfolie an. Nach Anfärbung des Prints mit Ponceau S war die Trennung innerhalb von 2 Minuten sichtbar. Nachteil dieser Färbemethode war rasches Verblässen der Banden innerhalb weniger Tage trotz Imprägnierung der Folie mit Polyethylenglykol 200.

Der Verlauf des pH-Gradienten wurde mit proteinhaltiger Gelsuspension bei 4 °C auf entsprechend empfindlichem Indikatorpapier getüpfelt. Glaselektroden waren durch lange Äquilibrierungszeiten in der Kälte hinderlich und führten nicht zu wesentlich genaueren Werten.

5.7. Elektroelution

Mit der Apparatur Biotrap (Fa. Schleicher & Schüll) wurden in Anlehnung an die bei JACOBS und CLAD (1985) für SDS-Gele beschriebene Elutionsmethode Fraktionen der präparativen isoelektrischen Fokussierung in einem Arbeitsgang von Trägerampholyten befreit und konzentriert.

In einer beidseitig von semipermeablen Membranen (Ausschlußgröße MW 5000) abgeschlossenen Rinne ist neben der Anodenmembran ein weiteres Rückhaltefilter (2 μ m Porenweite) eingebracht, das ein kleines Fallenvolumen vor Einströmen des restlichen Rinneninhaltes schützt. In dieser Apparatur, eingesetzt in eine Elektrophoresekammer mit Tris/Glycin Puffer 25 mM/80 mM pH 8,5, wurde Gelsuspension in der Rinne mit Kammerpuffer aufgefüllt und unter Eiskühlung der Kammer 12 Stunden mit 200 V bei ca. 15 mA Stromfluß und 3 W Leistung eluiert. Vor Entnahme des Falleninhaltes wurde die Stromrichtung für ca. 10 Sekunden umgekehrt, um Protein-Adsorption an der Anodenmembran zu verhindern.

6. Spektroskopische Methoden.

6.1. Massenspektroskopie.

Die Massenspektren wurden unter EI-Bedingungen (Elektro-nenstoß-Ionisation) aufgenommen. Die dabei auftretenden typischen Fragmentierungen von Indolalkaloiden, wie sie bei HESSE (1974) erläutert sind, seien beispielhaft für Tabersonin (Vincadifformin-Typ) angeführt (Abb. 11):

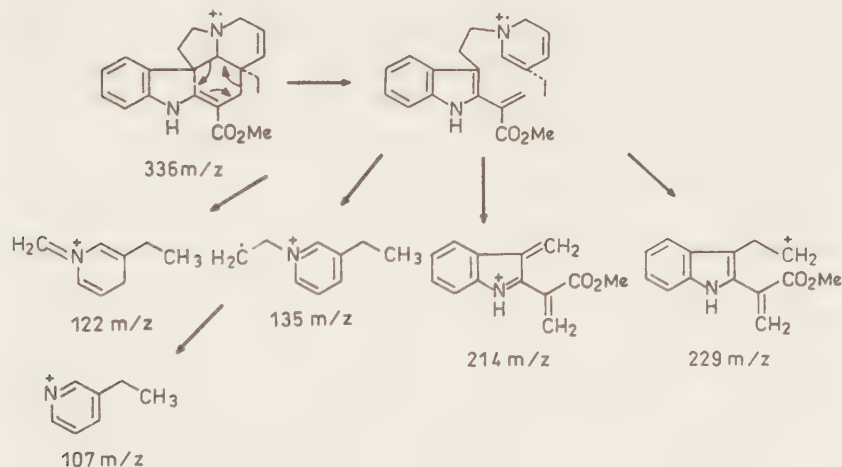


Abb. 11a: Die Fragmentierung von Tabersonin



Abb. 11b: Das Massenspektrum von Tabersonin

6.2. Kernresonanzspektroskopie.

Bei der Fourier-Transformations (FT) -NMR-Spektroskopie werden durch einen Hochfrequenzimpuls alle Atomkerne gleichzeitig in Resonanz gebracht. Die anschließend von den so angeregten Atomkernen wieder abgegebene Energie wird als Abklingkurve (Free Induction Decay, FID) registriert. Durch mathematische Umformung dieser sich überlagernden Sinuswellen mit Fourier-Transformation erhält man die einzelnen Kernresonanzen.

Zu weiteren Informationen gelangt man durch Einführen einer Zeitspanne, die man zwischen Anregung und Signalaufnahme verstreichen läßt. In dieser Zwischenzeit können sich, durch weitere Hochfrequenz-Impulse beeinflusbar, Wechselwirkungen in dem angeregten Spinsystem entwickeln. Durch geeignete Länge und Abfolge dieser Impulse lassen sich so in einem DEPT-Experiment (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) CH_3 , CH_2 , CH und quartäre C-Atome unterscheiden. Durch Wahl bestimmter Pulsfolgen erscheinen gleichzeitig CH_3 -, CH_2 -, CH - oder nur CH -Signale oder CH_3 - und CH -Signale mit positiver und CH_2 -Signale mit negativer Amplitude. Durch

Vergleich mit dem normal aufgenommenen ^{13}C -Spektrum sind dann auch quartäre C-Atome zu ermitteln.

Zweidimensionale NMR-Spektren werden durch Variation der Zeitspanne zwischen Anregung und Registrierung des Signals erhalten. So sind z.B. in dem Konturdiagramm eines COSY-Spektrums (Correlated Spectroscopy) auf einfache Weise miteinander koppelnde Protonen-Signale zu erkennen. Sie stellen sich als von der Diagonale des in Aufsicht gesehenen Spektrums abweichende "Cross-Peaks" dar. Durch senkrechte und waagrechte Verbindungslinien dieser Cross-Peaks zur Diagonale lassen sich dann die Signale dieser Kopplungspartner auffinden. Ebenso ist diese Zuordnung durch Doppelresonanzmessungen möglich. Dazu muß selektiv jeder einzelne Kopplungspartner durch Einstrahlen seiner Resonanzfrequenz neutralisiert und der Verlust der mit diesem Signal eingegangenen Kopplungen registriert werden (Übersicht bei RAHMAN, 1986).

7. Computergestützte Molekülgraphik.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Modelle von Molekülgerüsten mit dem Programm ALCHEMY erstellt und deren Konformationen mit dem Programm SYBYL (beide Evans und Sutherland) analysiert. Die dazu durchgeführten Manipulationen lassen sich im Wesentlichen mit dem Bau und der Handhabung von Dreiding-Modellen vergleichen. Jedoch liefert die computergestützte Methode als wesentlichen Unterschied Energieberechnungen zu den einzelnen Konformeren. Ebenso ist das Abmessen von Bindungswinkeln und Atom-Abständen über den Raum hinweg vereinfacht. Schließlich ist bei komplex aufgebauten Alkaloiden die Anfertigung solcher elektronischer Modelle auf dem Personal Computer ökonomischer.

Zur Energieberechnung von Molekülen sind aufwendige quantenmechanische Berechnungen, etwa von Molekül-Orbitalen möglich. Dem steht der hohe Rechenaufwand entgegen. Gebräuchlicher sind deshalb Valenzkraftfeld-Berechnungen, die für praktische Anwendungen zu hinreichend genauen Ergebnissen führen. Dieses Kraftfeld besteht aus den Komponenten, die die Struktur des Molekülgerüstes ausmachen, also Energiebeiträgen

von Bindungen, Atomradien und Ladungen. Dabei handelt es sich um ein semiempirisches Verfahren, bei dem sowohl experimentell ermittelte als auch quantenmechanisch berechnete Kraftfeld-Parameter benutzt werden. Diese Parameter bezeichnen dann die Elastizität, mit der einzelne Bestandteile des Molekülgerüsts in ihrer Lage zueinander variieren können. Prinzipieller Nachteil dieser Berechnungen ist, daß dabei errechnete Coulombsche Wechselwirkungen nicht die Polarisierbarkeit von Ladungen und so induzierte Dipole berücksichtigen können (FRÜHBEIS *et al.*, 1987).

Das vom Programm SYBYL in der Version 5.05 zur Energieberechnung benützte Kraftfeld besteht aus einer Summe von Energiepotential-Funktionen. Dabei gehen Bindungslänge (A), Bindungswinkel (B), Torsionsenergie (C), Verbiegen der planaren Bindung von sp^2 -hybridisierten Atomen in trigonale Bindungen (D), van der Waals- (E) sowie elektrostatische Wechselwirkungen (F) mit ein (Ausgabeschema des Programms SYBYL):

Energy for molecule :

Bond Stretching Energy	(A)
Angle Bending Energy	(B)
Torsional Energy	(C)
Out of Plane Bending Energy	(D)
1-4 van der Waals Energy	(E)
van der Waals Energy	(E)
1-4 Electrostatic Energy	(F)
Electrostatic Energy	(F)
=====	
Total Energy	

Für jede dieser Komponenten besitzt das Programm vordefinierte Kraftfeld-Konstanten. Die so errechneten Energiebeiträge definieren sich als Abweichung zur rein hypothetischen Situation, daß alle Gerüstbausteine ihren energetischen Idealzustand einnehmen können. Diese Gesamtenergie hat so als absolute Größe also keine physikalische Bedeutung. Sie ist aber als Bezugspunkt für Energiedifferenzen zu anderen Zuständen dieses Moleküls zu sehen.

Um die Energie eines so elektronisch aufgebauten Molekülgerüsts zu berechnen, muß dazu dessen Konformation erst energetisch minimiert werden. Bei dieser Optimierungsaufgabe findet das Programm das nächstliegende lokale, also relative Minimum der Konformationsenergie auf. Dieses kann beträchtlich über dem energieärmsten Zustand dieses Moleküls liegen. Um das absolute Minimum der Konformations-Energie zu ermitteln, muß also systematisch nach solchen Konformeren gesucht werden. Dies läßt sich durch Variation der Torsionswinkel von nicht in Ringsystemen fixierten Bindungen erreichen. Bei der Konformationsanalyse von dimeren und trimeren Molekülen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, vereinfachte sich diese Aufgabe. So wurden nur die Torsionswinkel der Verknüpfungen zwischen den optimierten monomeren Einheiten variiert. Dabei waren zwei Vorgaben möglich: Entweder wurden nur real existenzfähige Konformere erfaßt, bei denen sich keine oder nur geringfügige Überlappungen der van der Waals Radien ergaben. Diese waren wegen des empirischen Charakters der Parameter zu tolerieren. Oder es wurden auch Konformere berechnet, die deutliche Konflikte in der räumlichen Anordnung der Atome aufwiesen. Damit ließ sich dann die Energiebarriere der freien Rotation um die variierte Bindung ermitteln.

III. Ergebnisse

A. Untersuchungen zur Abschlußreaktion der Biosynthese des Ajmalin in *Rauwolfia serpentina* Zellkulturen.

Im Alkaloidmuster der Zellkultur von *R. serpentina* lassen sich sowohl Norajmalin als auch 17-O-Acetylnorajmalin auffinden. Korrespondierend sind auch Ajmalin und 17-O-Acetyljmalin vorhanden. Um die beiden nötigen enzymatischen Methylierungen vergleichen und damit eine Aussage über die bevorzugte Biosynthesesequenz treffen zu können, sollten beide Nor-Verbindungen der von A.PFITZNER (1984) beschriebenen Methyltransferase angeboten werden.

1. Darstellung der Substrate 17-O-Acetylnorajmalin und Norajmalin

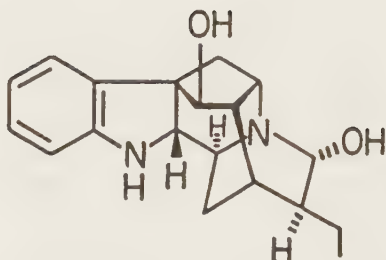
Wegen variierendem Gehalt an Nor-Derivaten von Ajmalin war es wünschenswert, von der Alkaloid-Isolierung aus der Zellkultur von *Rauwolfia serpentina* unabhängig zu werden. Es wurde der Versuch unternommen, durch Entfernung der Methylgruppe am Dihydroindol-Stickstoff im Ajmalin zum Substrat für die Methyltransferase zu gelangen. Mit den geläufigen schonenderen chemischen Methoden zur N-Demethylierung von Alkaloiden wie Umsetzung mit Trichlorethylchlorformat und anschließende Hydrogenolyse des Carbamates (PFISTER, 1978), Reaktion mit Diethylazodicarboxylat (DIELS und FISCHER, 1914) oder Oxidation mit Permanganat im Neutralen (BANHOLZER et al., 1969) wurde hier wegen der geringen Reaktivität des Dihydroindolstickstoffs kein Umsatz zu Norajmalin über 1% beobachtet. Photochemisch war eine Demethylierung von Ajmalin mit 3% Ausbeute beschrieben (HERLEM et al., 1973). Die gewünschte Reaktion konnte jedoch erst durch Anwendung einer mikrobiologischen Methode in akzeptabler Ausbeute erreicht werden.

Rauwolfia-Alkaloide waren mit die ersten Vertreter ihrer Stoffklasse, die auf ihren Umbau durch Mikroorganismen untersucht wurden. So ließen sich mikrobielle Hydroxylierungen von α - und β -Yohimbin an spezifischen Positionen des Yohimbangerüsts (PAN und WEISENBORN, 1958; GODTFREDSEN et al., 1958; LOO und REIDENBERG, 1959; PATTERSON et al., 1963) durchführen. Präparativ wurden solche methodischen Ansätze zur Synthese antikonvulsiver Derivate von Ajmalicin und Corynanthin fortgeführt (BELLET und VANTHUONG, 1972). Die N-Demethylierung von Ajmalin (BELLET und VANTHUONG, 1968) verläuft ebenso mit hoher Ausbeute.

Dealkylierungen am Stickstoff sind wichtige Biotransformationen pharmakologisch aktiver Stoffe und lassen sich mikrobiologisch nachahmen und präparativ nutzen (GIBSON et al., 1984). Dabei kann in stationärer Kultur mit dem N-Alkyl als einzig verfügbarer Kohlenstoffquelle oder in logarithmisch wachsender Kultur in Vollmedien umgesetzt werden (SEWELL et al., 1979). Letztere Möglichkeit wurde mit der Methode nach BELLET und VANTHUONG verfolgt. Sie wurde folgendermaßen modifiziert: *Streptomyces platensis* NRRL 2364 wurde zunächst auf Rz-Agar bei 30 °C angezogen. Etwa 3 cm² der Agaroberfläche überführte man in einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit 60 ml CSL-Medium. Nach 48 Stunden Schütteln mit 200 rpm bei 28 °C wurde eine zweite Kulturstufe mit 10% Inokulum auf DH-Medium überimpft. Nach weiteren 28 Stunden erfolgte pro 100 ml Kultur die Zugabe von 20 mg Ajmalin, das in 1 ml Ethanol gelöst war. Nach 5 Tagen Schütteln wurde das Medium mit HCl auf pH 3-4 angesäuert, dann von der Bakterien-suspension über ein engmaschiges Nylonnetz abfiltriert, mit Ammoniaklösung alkalisiert (pH 10) und schließlich erschöpfend gegen Dichlormethan ausgeschüttelt.

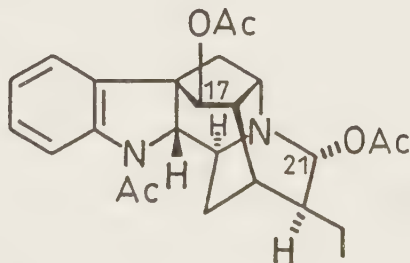
N α -Norajmalin wurde durch chromatographische Auftrennung des Rückstands der organischen Phase auf Kieselgel-Dickschichtplatten in LM A gewonnen. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 30%.

Norajmalin.

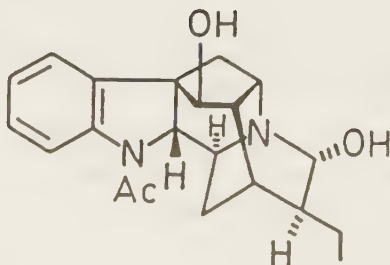


Als weiteres N-Norsubstrat wurde 17-O-Acetylnorajmalin benötigt. Durch Acetylierung von Norajmalin war dieses Substrat nicht zugänglich. Aus Reaktion in Acetanhydrid/Pyridin bei Raumtemperatur (II.B.1.1.) resultierte die Bildung von Na-17-O-21-O-Triacetylnorajmalin, das sich durch Verseifen in 2 N Sodalösung bei RT in Na-Acetylnorajmalin, jedoch nicht in 17-O-Acetylnorajmalin überführen läßt.

Triacetylnorajmalin.

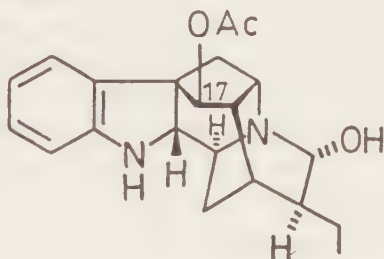


N-Acetylnorajmalin.



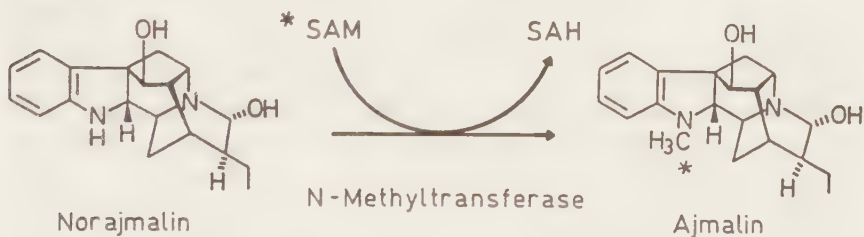
Dagegen läßt sich Ajmalin ohne Beteiligung des Dihydroindol-Stickstoffs acetylieren (II.B.1.1.). Stabil ist das 17-O-Acetylderivat. Wurde dieses in analogen Ansätzen von *S. platensis* umgesetzt, resultierte das gewünschte 17-O-Acetylnorajmalin in 35% Ausbeute.

17-O-Acetylnorajmalin.



2. Enzymtest für die Norajmalin-N α -Methyltransferase

Der von A.PFITZNER (1984) entwickelte Test stand bereits zur Verfügung. Es wird mit radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin und Norajmalin inkubiert; methyliertes Alkaloid kann anschließend mit Ethylacetat extrahiert werden, wogegen unverbrauchter Cofaktor in der wässrigen Phase verbleibt (Schema 8):



Schema 8: Radioaktiver Enzymtest für die Methyltransferase

Leider wurde bei Kontrollinkubationen mit aktivem Enzym, aber in Abwesenheit von Alkaloid-Substrat ebensoviel Radioaktivität in der organischen Phase verzeichnet wie in Gegenwart von Norajmalin. Auch nach Abziehen flüchtiger Reaktionsprodukte waren beide aus dem Rückstand ermittelten Werte gleichermaßen erniedrigt. Dies machte eine dünnschichtchromatographische

Auftrennung der radioaktiven Reaktionsprodukte notwendig. So wurde gebildetes Ajmalin durch die Radioaktivitätsverteilung auf der Platte detektierbar. Zur quantitativen Auswertung eluierte man die entsprechende Kieselgelzone zur Messung im Szintillationszähler.

3. Solubilisierung der partikelassoziierten Methyltransferase

A. PFITZNER hatte 1984 die Methyltransferase-Aktivität aus einem Proteinrohextrakt von *R. serpentina* Zellsuspension erstmals nachgewiesen. Dieser Rohextrakt bestand aus dem Proteinniederschlag einer Ammoniumsulfatfällung mit 70% Sättigung. Dieser Niederschlag war, resuspendiert, über Sephadex G 25 entsalzt worden.

Für erste Reinigungsversuche war nun eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung naheliegend. Dazu wurden 100 g zwei Wochen gewachsenes *R. serpentina* Gewebe abgeerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in 50 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 und 20 mM β -Mercaptoethanol aufgetaut. Nach einer weiteren Stunde, während der der Aufschluß im Eisbad umgerührt wurde, folgte eine Filtration durch 4 Lagen Windelstoff. Das Filtrat ließ man 20 Minuten bei 10.000 g in der Zentrifuge. Der so gewonnene Überstand wurde zu 40% mit Ammoniumsulfat gesättigt und nochmals zentrifugiert. Aus diesem Überstand konnte nach weiterer Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur 70%-Sättigung ein zweiter Proteinniederschlag gewonnen werden. Die Niederschläge der 40%- und der 70%-Fällung wurden beide im Aufschlußpuffer aufgenommen und anschließend gegen denselben Puffer dialysiert. Diese beiden Proteinfractionen testete man auf Methyltransferase-Aktivität. Die Inkubationen bestanden aus je 3 mg Protein, 4 nmol Norajmalin und 10 pmol ^{14}C -SAM (2,2 Bq/pmol) in 0,5 ml Puffer und dauerten bei 30 °C zwei Stunden. Sie wurden anschließend mit je 1 ml Ethylacetat extrahiert und die eingeengten Essigester-Phasen mit je 5 μg Ajmalin zur Dünnschicht-Chromatographie aufgetragen. Parallel dazu fanden Kontrollversuche ohne Norajmalin statt. Abbildung 12 zeigt die Radioaktivitätsverteilung auf der im LM A

entwickelten Platte. Die Methyltransferase-Aktivität ließ sich mit einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 40% beinahe vollständig ausfällen. Weitere Fraktionierung zeigte, daß sich sämtliche Aktivität zwischen 10 und 45% Ammoniumsulfat-Sättigung im Niederschlag wiederfand.

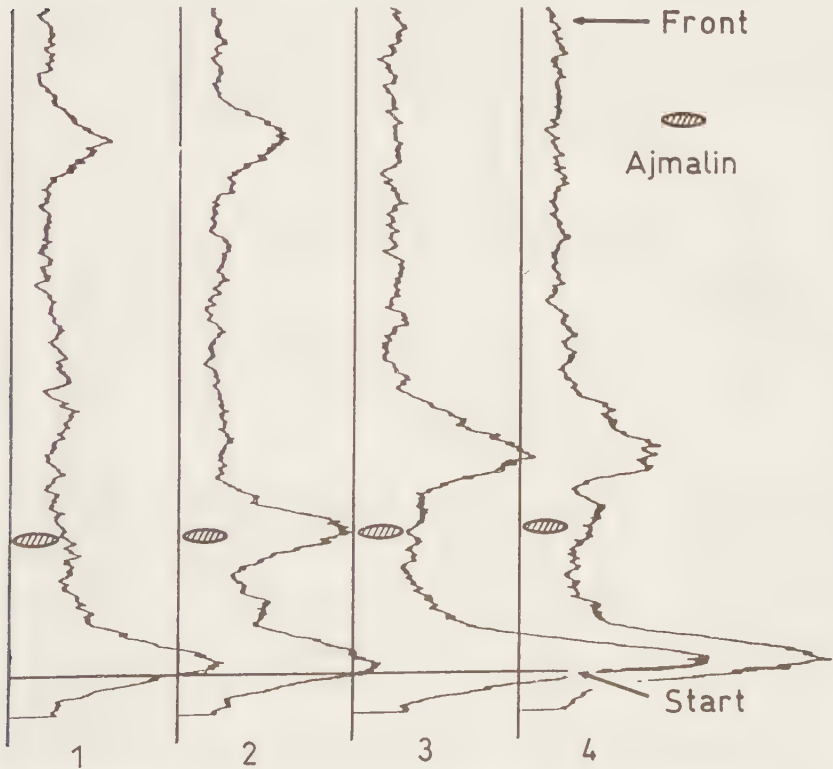


Abb. 12: Radioaktivitäts-Verteilung nach DC der organischen Phase von Inkubationen mit Protein der 40%-Fällung (2), 70%-Fällung (4) und der jeweiligen Kontrollinkubationen (1 und 3)

Da die Methyltransferase schon bei geringer Ammoniumsulfat-Konzentration präzipitierte, war der Einfluß der Ionenstärke im Aufschlußpuffer zu untersuchen. Dazu wurden diesem verschiedene KCl-Mengen zugesetzt. Nach Ammoniumsulfat-Fällung mit 50% Sättigung folgte die Entsalzung des resuspendierten

Proteins über Sephadex G 25. Bei einer KCl-Konzentration von 2 M im Aufschluß erhielt man um ein Drittel mehr Enzymaktivität als ohne Salz.

Eine so erhaltene Proteinpräparation wurde anschließend Gel-filtrationen über zwei verschiedene Chromatographie-Medien unterzogen. Bei der Auftrennung von je 30 mg Protein sowohl auf Fraktogel TSK HW 55 S als auch auf 65 S ließ sich nur im Ausschlußvolumen die Methyltransferase nachweisen. Abb.13 zeigt die Elutionsprofile und die Chromatographie-Bedingungen.

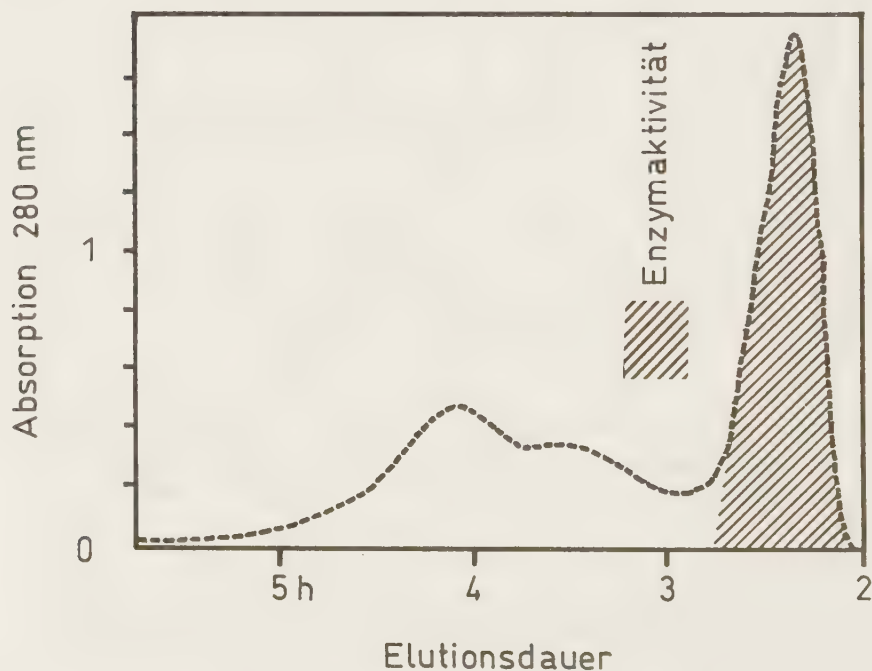


Abb. 13a: Gelfiltration der Norajmalin-N-Methyltransferase an Fraktogel TSK HW 55 S

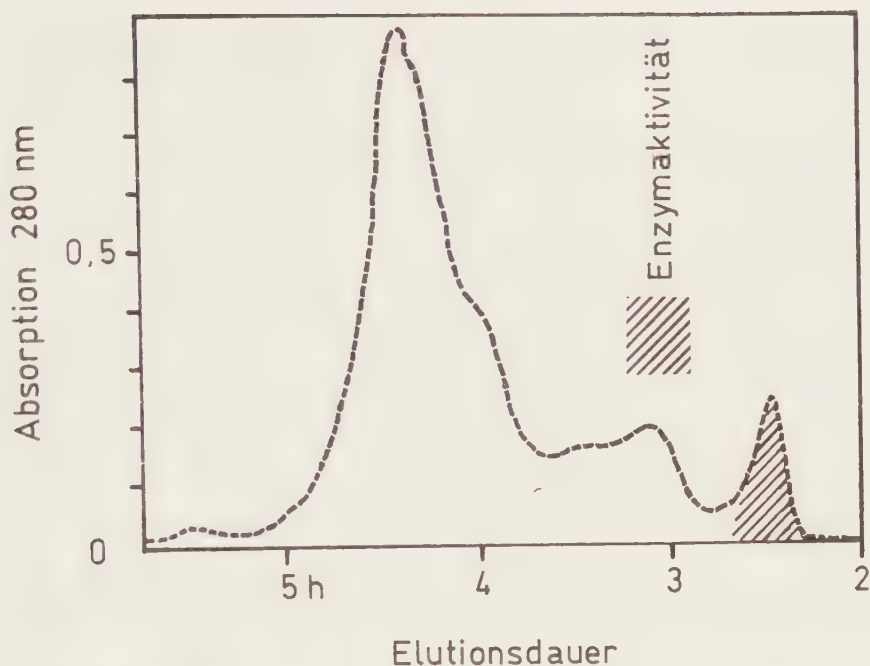


Abb. 13b: Gelfiltration an Fraktogel TSK HW 65 S. Beide Chromatographien in Säulen der Dimension 2,6 x 90 cm mit einer Flußrate von 3,8 cm/h in 0,1 M KP_i -Puffer pH 7,0.

Eine Druckfiltration zur Umgehung des Aussalz-Schrittes hielt die Enzymaktivität über einem Filter mit Durchlaßgrenze von 100.000 Dalton zurück. Auch in der hierauf folgenden Gelchromatographie an Fraktogel TSK HW 65 S fand sich die Methyltransferase im nicht retardierten Durchlauf. Da dieses Gelfiltrationsmaterial noch bis zu 10^6 Dalton große Assoziate auftrennen würde, deutete dieses Verhalten der Transferase stark auf ein partikelgebundenes Protein hin.

Im Hinblick darauf war die Aufschlußmethodik, bisher ausgerichtet auf lösliche Proteine, zu modifizieren. 100 g Gewebe wurden deshalb in flüssigem Stickstoff eingefroren, zwei Stunden in 100 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, 30% Glycerin, 2 M KCl und 20 mM MSH aufgetaut und dann im Eisbad weiter gerührt. Nach Abpressen des Breis durch 4 Lagen

Windelstoff zentrifugierte man das Filtrat 20 Minuten bei 30.000 g. Zum Überstand zugegebenes CaCl_2 in 10 mM Konzentration sollte eine Mikrosomenfraktion ausfallen (KAMATH und NORAYAN, 1972). Auch dieser Niederschlag wurde durch Zentrifugation gewonnen. Beide Präzipitate, Zelltrümmer und CaCl_2 -Pellet, ließ man in je 5 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 30 Glycerin, 100 mM KCl, 1% w/v Triton X 100 und 10 mM MSH 3 Stunden im Eisbad mit Magnetrührern suspendieren. Das Solubilisat konnte durch erneutes Zentrifugieren als Überstand gewonnen werden. Je 260 μl aus beiden Fraktionen inkubierten mit 20 nmol Norajmalin, und 5 nmol ^3H -SAM (18,5 kBq) zu 0,3 ml Gesamtvolumen in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8 30 Minuten bei 30 °C. Die Reaktion wurde mit 10 μl 1 N Natronlauge gestoppt und mit je 0,2 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase trug man quantitativ zusammen mit je 5 μg Ajmalin zur DC auf. Nach Auftrennung im LM A war die Radioaktivität wie in Abbildung 14 ersichtlich verteilt. Aus Zelltrümmern solubilisierte Methyltransferase lieferte neunmal soviel radioaktives Ajmalin als die CaCl_2 -Präparation.

Eine eindeutige Identifizierung des Reaktionsproduktes erfolgte nach Abbildung 14 durch nochmalige Chromatographie im LM E und nach Acetylierung (II.B.1.1.) zum Diacetyljmalin (LM A). Die weitere Entwicklung der Aufschlußmethodik konzentrierte sich darauf, geeignete Zellmembran-Fraktionen zu gewinnen und die Bedingungen der Enzymsolubilisierung zu optimieren. In Anlehnung an bei HALL (1983) beschriebene Aufschlüsse wurden 100 g Zellkulturgewebe in 100 ml Puffer, bestehend aus 0,25 M Saccharose, 50 mM Tris·HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA und 20 mM MSH, unter Eiskühlung 30 Sekunden in einem Sorvall-Mixer homogenisiert. Den so erhaltenen Brei unterwarf man 15 Minuten lang einer Zentrifugation bei 1000 g, den gewonnenen Überstand weitere 45 Minuten bei 40.000 g. Der Niederschlag des zweiten Schrittes diente als Ausgangsmaterial für eine Solubilisierung der Methyltransferase.

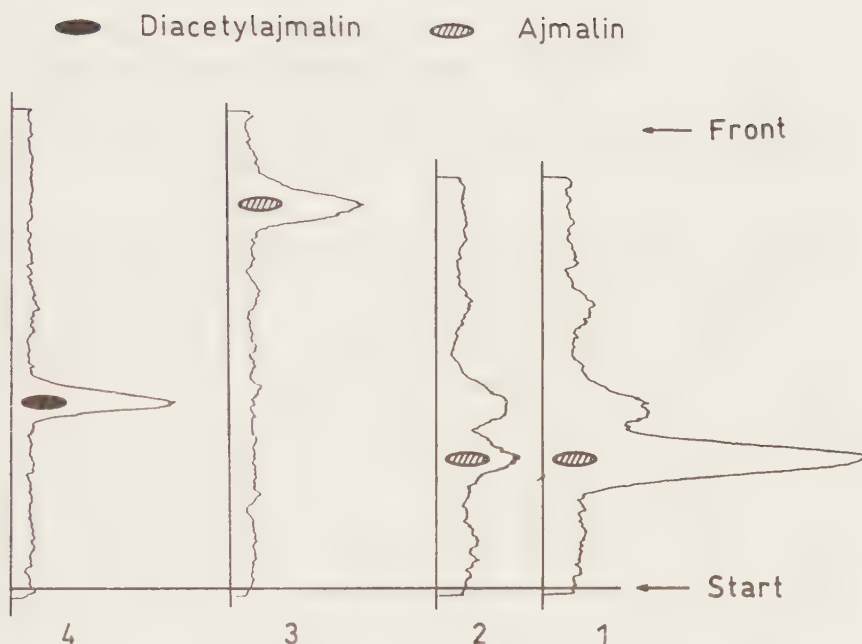


Abb. 14: Radioaktivitäts-Verteilung nach DC im LM A: Inkubation mit solubilisierter Methyltransferase (1), Kontrollinkubation (2); Rechromatographie des Enzymproduktes in LM E (3); Derivatisierung des Enzymproduktes, DC in LM A (4).

Für diesen Schritt waren verschiedene Möglichkeiten der Lösungsvermittlung zu vergleichen. In einem 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit 100 mM KCl, 10 mM MSH und 20% Glycerin wurden je 1% CHAPS, 30 mM Octylglucosid, 1% Triton X 100, 10 mM EDTA und 0,1% Natriumdesoxycholat wie schon für Triton X beschrieben eingesetzt. Der Vergleich zwischen den gewonnenen Methyltransferase-Präparationen, bezogen auf Triton X:

Triton X 100	100%
CHAPS	80%
β -Octylglucosid	20%
Natrium-Desoxycholat	0%
EDTA	0%

Weitere Solubilisate wurden mit Triton X 100 erzeugt, variierende KCl-Konzentrationen zeigten dabei keinerlei Einfluß auf die erhaltene Methyltransferase-Aktivität. Diese verlor sich trotz Aufbewahrung bei 0 °C unter Oxidationsschutz innerhalb einer Woche.

Die nächste Problemstellung ergab sich aus der Notwendigkeit, überschüssiges Tensid, ebenfalls solubilisierete Lipide und vor allem Alkaloide vom in Lösung gebrachten Enzym abzutrennen. Die einfachste Methode, Adsorption an XAD2 (FURTH, 1980) führte zum Verlust auch der Enzymaktivität. Deshalb wurde eine Trennung über Gelchromatographie (FURTH et al., 1984) vorgezogen. Eine Fraktogel TSK HW 65 S Säule der Dimension 1,6 x 50 cm war dazu mit 8 ml/Stunde von 20 mM Tris·HCl Puffer pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM DTE, 0,25 M Saccharose und 0,02% Triton vorgespült worden. Die eingesetzte Tensidkonzentration stellte sicher, daß man während der Chromatographie die kritische Micellbildungs-Konzentration (CMC) nicht unterschritt. 1 mg solubilisiertes Protein in 2 ml Puffer mit 1% Triton wurden aufgegeben und Fraktionen zu 0,6 ml aufgefangen. Zur Suche nach Methyltransferase-Aktivität inkubierten je 200 µl Eluat dieser Chromatographie mit 10 nmol Norajmalin und 2 nmol ³H-SAM (3,5 kBq) 5 Stunden bei 30 °C. Zur Auswertung maß man über DC abgetrenntes Ajmalin im Szintillationszähler. Abbildung 15 verdeutlicht, daß sowohl eine Abtrennung der reinen Tensid-Micellen als auch eine weitere Differenzierung der solubilisierten Proteine gelang.

Diese Vorarbeiten können nun zu einer weiteren Reinigung und Charakterisierung des bisher einzigen membranständigen Enzyms der Ajmalin-Biosynthese verwendet werden.

4. Untersuchung zur Substratspezifität der N_α-Methyltransferase

Für den Vergleich der beiden möglichen Substrate Acetylnorajmalin und Norajmalin stand durch mikrobielle N-Demethylierung genügend an diesen Noralkaloiden zur Verfügung.

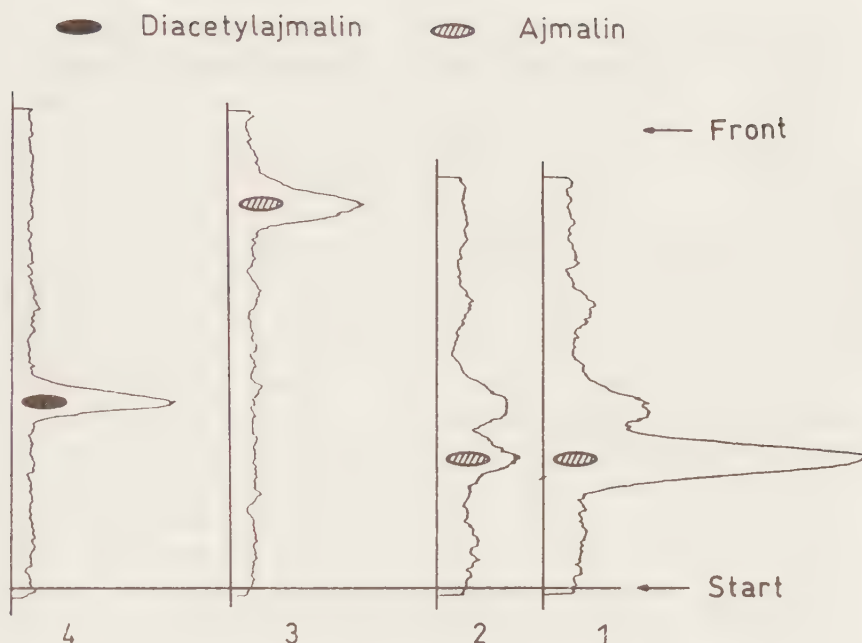


Abb. 14: Radioaktivitäts-Verteilung nach DC im LM A: Inkubation mit solubilisierter Methyltransferase (1), Kontrollinkubation (2); Rechromatographie des Enzymproduktes in LM E (3); Derivatisierung des Enzymproduktes, DC in LM A (4).

Für diesen Schritt waren verschiedene Möglichkeiten der Lösungsvermittlung zu vergleichen. In einem 50 mM Tris·HCl-Puffer pH 7,5 mit 100 mM KCl, 10 mM MSH und 20% Glycerin wurden je 1% CHAPS, 30 mM Octylglucosid, 1% Triton X 100, 10 mM EDTA und 0,1% Natriumdesoxycholat wie schon für Triton X beschrieben eingesetzt. Der Vergleich zwischen den gewonnenen Methyltransferase-Präparationen, bezogen auf Triton X:

Triton X 100	100%
CHAPS	80%
β -Octylglucosid	20%
Natrium-Desoxycholat	0%
EDTA	0%

Weitere Solubilisate wurden mit Triton X 100 erzeugt, variierende KCl-Konzentrationen zeigten dabei keinerlei Einfluß auf die erhaltene Methyltransferase-Aktivität. Diese verlor sich trotz Aufbewahrung bei 0 °C unter Oxidationsschutz innerhalb einer Woche.

Die nächste Problemstellung ergab sich aus der Notwendigkeit, überschüssiges Tensid, ebenfalls solubilisierter Lipide und vor allem Alkaloide vom in Lösung gebrachten Enzym abzutrennen. Die einfachste Methode, Adsorption an XAD2 (FURTH, 1980) führte zum Verlust auch der Enzymaktivität. Deshalb wurde eine Trennung über Gelchromatographie (FURTH *et al.*, 1984) vorgezogen. Eine Fraktogel TSK HW 65 S Säule der Dimension 1,6 x 50 cm war dazu mit 8 ml/Stunde von 20 mM Tris·HCl Puffer pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM DTE, 0,25 M Saccharose und 0,02% Triton vorgespült worden. Die eingesetzte Tensidkonzentration stellte sicher, daß man während der Chromatographie die kritische Micellbildungs-Konzentration (CMC) nicht unterschritt. 1 mg solubilisiertes Protein in 2 ml Puffer mit 1% Triton wurden aufgegeben und Fraktionen zu 0,6 ml aufgefangen. Zur Suche nach Methyltransferase-Aktivität inkubierten je 200 µl Eluat dieser Chromatographie mit 10 nmol Norajmalin und 2 nmol ³H-SAM (3,5 kBq) 5 Stunden bei 30 °C. Zur Auswertung maß man über DC abgetrenntes Ajmalin im Szintillationszähler. Abbildung 15 verdeutlicht, daß sowohl eine Abtrennung der reinen Tensid-Micellen als auch eine weitere Differenzierung der solubilisierten Proteine gelang.

Diese Vorarbeiten können nun zu einer weiteren Reinigung und Charakterisierung des bisher einzigen membranständigen Enzyms der Ajmalin-Biosynthese verwendet werden.

4. Untersuchung zur Substratspezifität der N_α-Methyltransferase

Für den Vergleich der beiden möglichen Substrate Acetylnorajmalin und Norajmalin stand durch mikrobielle N-Demethylierung genügend an diesen Noralkaloiden zur Verfügung.

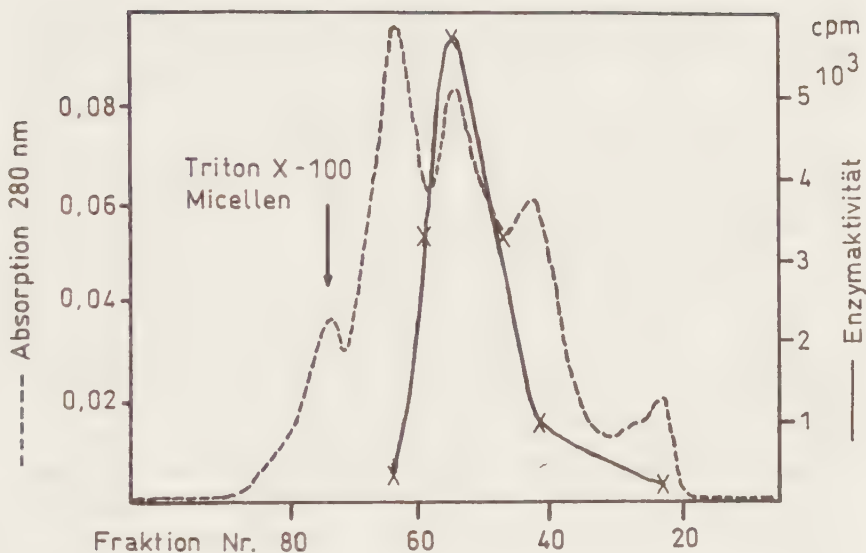


Abb. 15: Abtrennung von in Triton X 100 solubilisierter Norajmalin-N-Methyltransferase durch Gelfiltration

Beide wurden in einer Konzentration von 20 nmol in 0,3 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8 mit 5 nmol ³H-SAM (3,7 kBq) mit solubilisierter Methyltransferase (100 µg Protein) inkubiert. Der Triton X 100 -Anteil im Ansatz betrug 0,1%. Nach 90 Minuten bei 30 °C stoppte man die Reaktion durch Extraktion mit Ethylacetat. Zusammen mit je 5 µg Ajmalin bzw. Acetyljmalin wurde die eingeeengte Essigesterphase dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (LM A). Umsetzungsraten ließen sich durch Elution und Messung der radioaktiven Enzymprodukte ermitteln. Bei Einsatz verschiedener Enzympräparationen erhielt man einen Umsatz von Acetylnorajmalin von 40% bezogen auf Norajmalin (100%).

Weitergehende Aussagen zur Substratspezifität der Methyltransferase bleiben Untersuchungen mit mehr möglichen Substraten und der Ermittlung von K_m-Werten vorbehalten.

B. Untersuchungen zur Bildung von Vindolin und der Voafrine aus dem Vorläufer Tabersonin mit Enzymen von *C. roseus* Pflanzen

1. Versuche zur Intermediat-Isolierung aus *C. roseus* Fruchtwand

Eine Möglichkeit, die Abfolge von Biosynthese-Schritten eines Naturstoffes zu verfolgen, besteht in der Isolierung von schrittweise veränderten Intermediaten. Am Beispiel der Bildung von Vindolin war dies von QURESHI und SCOTT (1968) in *C. roseus* Keimlingen demonstriert worden. Dabei konnten Tabersonin und Methoxytabersonin als Vorläufer von Vindolin aufgefunden werden; zwischen Methoxytabersonin und Vindolin waren aber keine weiteren Intermediate mehr bekannt.

Da diese Zwischenprodukte einem raschen Umsatz unterliegen können, liegen sie in wesentlich niedrigerer stationärer Konzentration als die Endprodukte vor. Auch ist zu klären, ob es sich bei dem isolierten Produkt um ein (reversibles) Nebenprodukt oder wirklich um die direkte Vorstufe handelt. Als Beispiel sei hier Anhydrovinblastin aufgeführt, das zwar chemisch und enzymatisch in Vinblastin überzuführen ist, aber nach Meinung von KUTNEY et al. (1988b) erst über ein gemeinsames Zwischenprodukt wieder in den Vinblastin-Weg einfließen kann.

Obwohl *Catharanthus roseus* zu den phytochemisch mit am intensivsten bearbeiteten Pflanzen gehört, wurden bei über 90 isolierten Alkaloiden (RAHMAN et al., 1985) keine mit möglichem Intermediat-Charakter für den untersuchten Abschnitt der Vindolin-Biosynthese aufgefunden. Nachdem bereits auch die Blüten auf neue Alkaloide hin untersucht waren (RAHMAN et al., 1984b), wurde in einem bisher noch nicht phytochemisch bearbeiteten Pflanzenteil, der Fruchtschale, nach Vindolin-Vorläufern gesucht.

Im direkten Vergleich zwischen einem methanolischen Extrakt frischer Blätter und Fruchtschalen konnte durch Chromatographie in Laufmittel A und Massenspektroskopie in den Fruchtschalen Lochnericin, Lochnerinin, Vindolin, Vindorosin und (Epi-)Vindolinin festgestellt werden. Auffällig war dabei ein Alkaloid, das nur in dem Perikarp-Auszug zu entdecken war.

Mit R_f 0,5 (LM A) gerade noch über der Laufrhöhe von Vindolin, war diese Substanz mit roter CAS-Färbung zu detektieren. Aus 60 g getrockneter Fruchtwand konnten so 4 mg dieses Alkaloids isoliert und weiter untersucht werden.

Das UV-Spektrum ergab mit Absorptionsmaxima bei 212, 250 und 297 nm in Übereinstimmung mit der CAS-Färbung, daß es sich um ein Dihydroindol-Derivat handelte. Im Massenspektrum schienen auch die von Vindolin her bekannten Fragmente 174 und 188 m/z auf, jedoch war kein für Vindolin-Derivate typischer Basispeak bei 135 m/z zu erkennen:

EI-MS m/z (rel. Int.%): 384 (M^+ , 16), 354 (3), 329 (4), 232 (23), 210 (46), 200 (13), 188 (100), 187 (69), 174 (71), 166 (16), 125 (46), 111 (38).

Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren mit einer DEPT-Messung (II.B.6.2) 6 quartäre, 8 tertiäre, 4 sekundäre und 4 primäre C-Atome zu ermitteln; ein Aspidospermin-Gerüst wie bei Tabersonin und Vindolin war damit bereits ausgeschlossen:

^{13}C -NMR (DMSO- D_6): 172,6 ppm, 160,2 ppm, 154,16 ppm, 132,8 ppm, 65,7 ppm, 41,8 ppm quartäre C; 129,7 ppm, 122,1 ppm, 104,0 ppm, 97,5 ppm, 65,6 ppm, 53,0 ppm, 47,4 ppm, 38,3 ppm tertiäre C; 70,6 (3x) ppm, 55,4 ppm, 49,7 ppm sekundäre C; 51,7 ppm, 38,3 ppm, 15,4 ppm primäre C.

Im ^1H -NMR-Spektrum war die Substitution des Aromaten durch 3 Signale für aromatische Protonen mit jeweils meta-, para- oder meta- und para-Kopplungen erkennbar. Auffällig war ein Dublett bei 1.29 ppm, das von einer Methylgruppe (3H) stammte. Das mit dieser Methylgruppe koppelnde Signal eines Protons war stark nach niedrigem Feld verschoben (η , 3,02 ppm). Abbildung 15 zeigt eine Übersicht über dieses, in DMSO aufgenommene Spektrum.

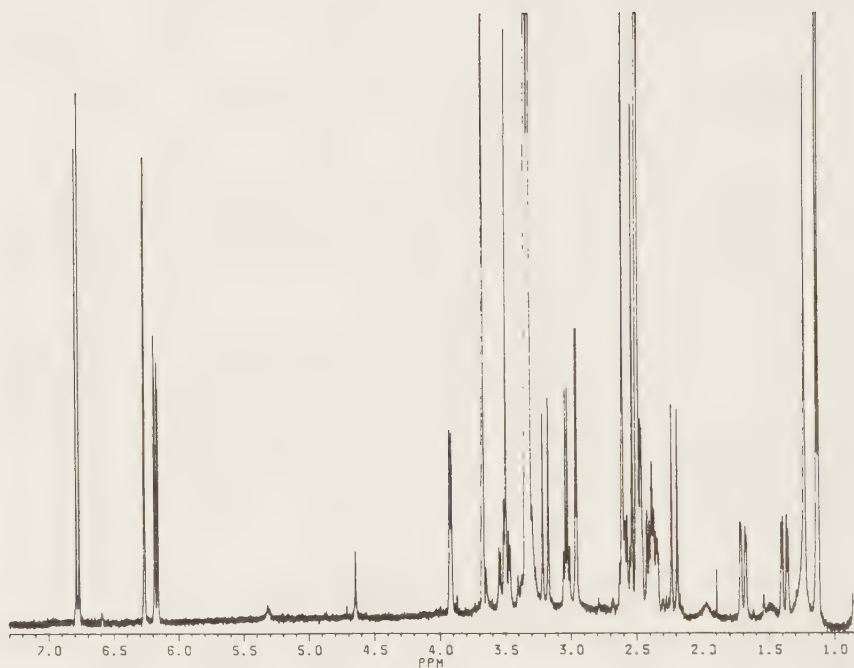


Abb. 15: Übersicht des ^1H -NMR-Spektrums des Alkaloids in DMSO
Durch COSY-Experimente (Abb. 16) und Doppelresonanz-Spektren (II.B.6.2.) in den Lösungsmitteln DMSO und Pyridin konnten die miteinander koppelnden Protonensignale ermittelt werden.

Aus einem hochauflösenden Massenspektrum wurde das Molekulargewicht zu 384,2025 ermittelt (Abb. 17). Daraus ergab sich eine Summenformel von $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$ (berechnet: 384,4742).

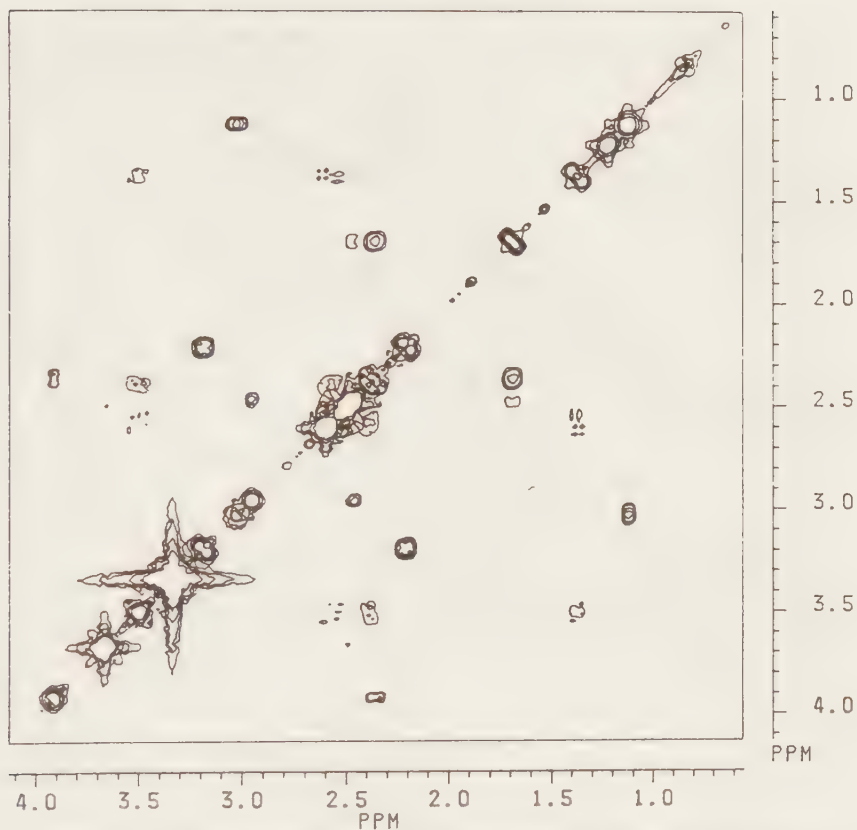


Abb. 16: Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum des Alkaloids

Da 3 Sauerstoff-Atome durch Carbomethoxy-Gruppe und Aryl-Methoxygruppe festgelegt waren (^{13}C -NMR: CO 172,6 ppm; OCH_3 2x 3,67 ppm) konnte die Verschiebung des Protonen-Signals bei 3,02 ppm so durch eine Epoxy-Gruppe erklärt werden. Darauf ließe sich der Strukturvorschlag in Abb. 18 aufbauen.

Ein Akuammicin-Gerüst könnte auch die Fragmente von 210 m/z ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}$), 188 m/z ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}$) und 174 m/z ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}$) im Massenspektrum erklären (Fragmentierung nach HESSE, 1974; Schema 9).

Die ^1H -NMR-Signale (Verschiebungen in ppm, Kopplungen in Hz):

Signal in DMSO	Kopplungspartner	Signal in Pyridin
1,12 (d, 5,75)	3,03 (5,69)	1,29
1,38 (dd, 14,8, 4,4)	2,59 (14,8), 3,50 (4,4)	1,79
1,69 (dd, 13,64; 3,37)	2,36 (m), 2,46 (3,44)	1,50
2,21 (d, 15,57)	3,19 (15,31)	2,34
2,36 (m)	1,69 (13,64), 3,92 (5,03)	2,53
2,40 (m)	3,50 (13,2), 2,59 (5,37)	2,49
2,46 (br d, 3,44)	1,69 (3,37), 2,90 (3,97)	2,73
2,53 (s)		2,46
2,59 (dd, 14,8, 5,37)	1,38 (14,8), 2,40 (m)	2,89
	3,50 (8,8)	
2,60 (s)		2,55
2,90 (d, 3,97)	2,46 (3,44)	2,98
3,03 (q, 5,69)	1,12 (5,75)	3,02
3,19 (d, 15,31)	2,21 (15,57)	3,62
3,50 (ddd, 13,2, 8,8, 4,4)	2,40 (m)	3,87
	2,59 (5,37), 1,38 (4,4)	
3,67 (2xs)		3,71
		3,84
3,92 (d, 5,03)	2,36 (m)	4,03
6,17 (dd, 8,17, 2,36)	6,26 (2,33), 6,77 (8,15)	
6,26 (d, 2,33)	6,17 (2,36)	
6,77 (d, 8,15)	6,17 (8,17)	

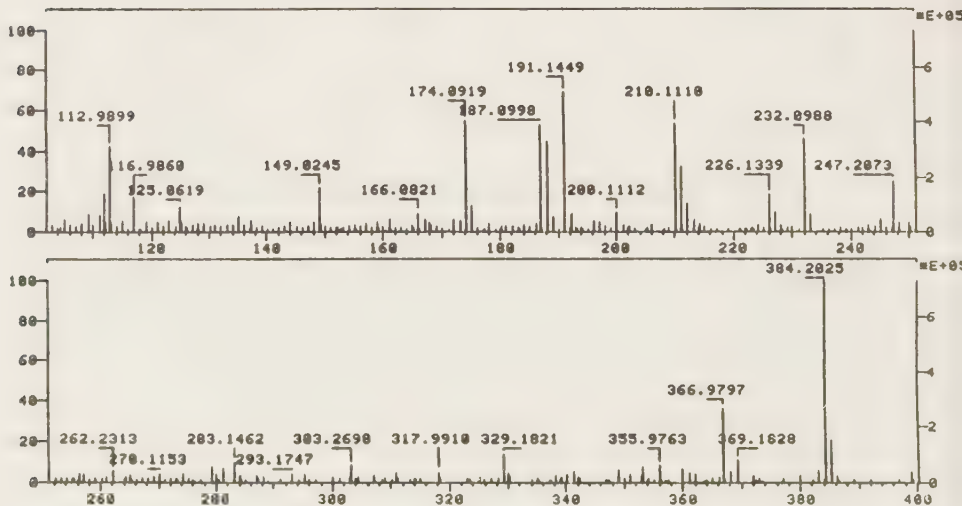


Abb. 17: Hochauflösendes Massenspektrum des Alkaloids

Nicht gestützt wird dieser Strukturvorschlag von dem so nicht ableitbaren Bruchstück mit 232 m/z ($C_{12}H_{14}NO_3$). Ebenso stört die Beobachtung einer geringen Kopplung des Protonen-Signals bei 2,46 ppm mit den Resonanzlinien bei 2,40 und 2,59 ppm. Weitere Untersuchungen sind also nötig, um den Aufbau dieses Alkaloids zu klären.

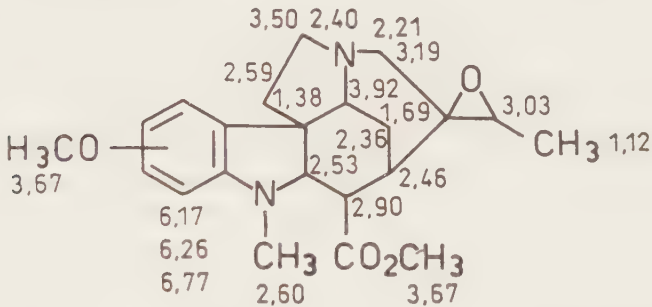
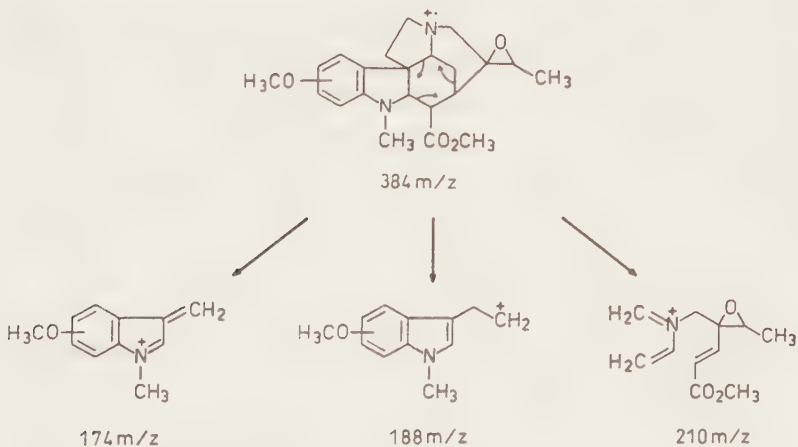


Abb. 18: Strukturvorschlag für ein Alkaloid aus *Catharanthus roseus* Fruchtschalen mit Zuordnungen der ^1H -NMR-Signale (ppm)



Schema 9: Möglicher Weg zu Hauptfragmenten des Massenspektrums

2. Untersuchungen mit Tabersonin zur Bildung von Vindolin und der Voافرine.

Tabersonin war als gesichertes Intermediat (QURESHI und SCOTT, 1968) Ausgangspunkt für den untersuchten Abschnitt der Vindolin-Biosynthese. Für einen hohen Umsatz dieses biogenetischen Vorläufers spricht, daß er in den Blättern von *C. roseus* nur als Spurenalkaloid auftritt. Es war deshalb naheliegend, dieses Alkaloid einem Proteinextrakt aus *C. roseus* zur enzymatischen Umsetzung anzubieten.

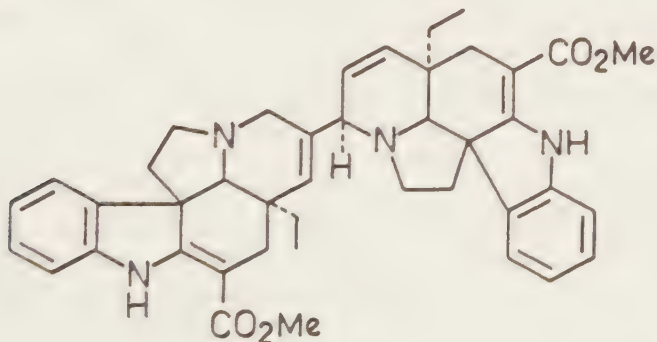
2.1. Zellfreier Umsatz von Tabersonin mit *C. roseus* Enzymen

20 g Blätter wurden unter Stickstoff eingefroren, in einer Schlagmesser-Mühle (IKA M20) vermahlen und mit 20 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 und 14 mM MSH aufgetaut. Nach 30 minütigem Rühren bei 0 °C filtrierte man durch 4 Lagen Windelstoff und zentrifugierte das Filtrat bei 15.000 g (30 min). Dem so erhaltenen Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zu 70% der Sättigung zugegeben und diese Salzlösung nochmals zentrifugiert. Das präzipitierte Protein ließ sich in 5 ml Aufschlußpuffer wieder in Lösung bringen, ungelöst gebliebener Niederschlag wiederum abzentrifugieren. Über eine mit Puffer ohne MSH äquilibrierte Sephadex G 25 Säule konnten von diesem Proteinrohextrakt Salze, Cofaktoren und endogene Alkaloide abgetrennt werden.

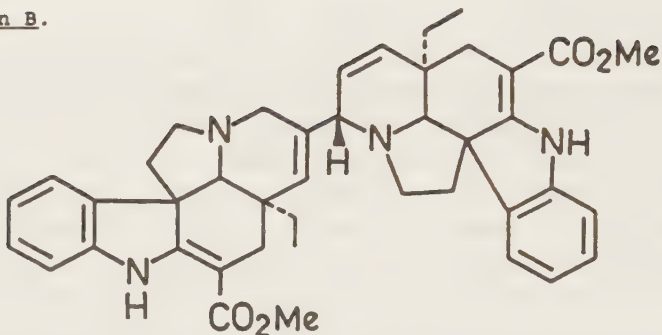
Als erste Reaktionsschritte der Sequenz Tabersonin $\longrightarrow$ Vindolin waren Umsetzungen mit NADPH als Cofaktor denkbar, wie Hydroxylierungen und Reduktionen. So wurde Tabersonin (20 nmol), in 20 µl Methanol gelöst, zusammen mit 1 mg Rohprotein in 0,3 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Dabei hielten 8 nkat Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase mit 4,5 µmol Glucose-6-phosphat die zugefügte Menge von 0,9 µmol NADPH konstant. Kontrollversuche stellten Ansätze ohne NADPH, mit hitzedenaturiertem Protein, und alleine mit regenerierendem NADPH dar. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit je 0,3 ml Ethylacetat beendet. Die organische Phase trug man nach Einengen quantitativ auf eine

Kieselgel-Dünnschichtplatte auf. Die Entwicklung der Chromatogramme (LM A) ergab Überraschenderweise nur bei den als Kontrolle gedachten Inkubationen mit aktivem *Catharanthus*-Protein in Abwesenheit von NADPH zwei unterhalb des Tabersonin (R_f 0,75) detektierbare Reaktionsprodukte (R_f 0,7; 0,65). Diese Alkaloidbanden zeigten, wie das zu ca. 40% umgesetzte Tabersonin, eine blaue Fluoreszenz bei 340 nm UV-Licht und eine ebenfalls blaue CAS-Färbung. Massenspektren konnten nach Vergrößerung des Enzymsatzes auf 3 ml und Reinigung im LM B (R_f 0,4; 0,3) aufgenommen werden. Aus dem Molekulargewicht von 670 (Tabersonin 336) beider Verbindungen war zu ersehen, daß es sich nicht um gesuchte Biosynthese-Intermediate handelte. Vielmehr lag eine Verknüpfung zweier Tabersonyl-Einheiten nahe. Die Aufklärung der Struktur dieser komplexen Moleküle wurde dadurch vereinfacht, daß bereits von STÖCKIGT et al. (1984) ebensolche Bisindol-Alkaloide in der Zellsuspension von *Voacanga africana* Stapf. aufgefunden worden waren. Diese Verbindungen, Voafirin A und Voafirin B, stellten die ersten von kultivierten Pflanzenzellen gebildeten dimeren Indolalkaloide dar. Eine Cochromatographie mit diesen Referenzalkaloiden deutete bereits an, daß es sich bei den neuen Reaktionsprodukten um diese bereits bekannten Verbindungen handelte. Durch den Vergleich der UV-, EI-MS-, und, im Falle von Voafirin B (niedrigerer R_f -Wert), der NMR-Daten konnte dies eindeutig belegt werden.

Voafirin A.



Voafrin B.



Aus Tabersonin waren durch *C.roseus* Proteinextrakt Voafrin A und Voafrin B im Verhältnis 1:1 gebildet worden.

Da Voafrin A und B selbst unter optimierten Bedingungen lediglich in Ausbeuten von 30 mg/l Medium aus der Zellkultur von *Voacanga africana* isoliert werden konnten (PAWELKA, 1985), war dieser neue Zugang zu den Tabersonin-Dimeren auch von präparativem Interesse. Zur Darstellung größerer Mengen gab man Tabersonin bis über die Grenze der Löslichkeit dem Enzymansatz zu.

2.2. Enzymatische Dimerisierung von Tabersonin im präparativen Maßstab

Aus 800 g *C. roseus* Blättern wurden wie oben beschrieben 100 ml Rohextrakt mit 1,2 g Protein gewonnen und mit 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 auf 800 ml aufgefüllt. Unter ständigem Umschütteln in einem Fernbach-Kolben tropfte man dieser Proteinlösung 1 g Tabersonin·HCl (2,7 mmol) in 20 ml Methanol langsam zu. Das so erzeugte trübe Reaktionsgemisch wurde unter Sauerstoff-Atmosphäre bei 25 °C mit 100 rpm 18 Stunden lang geschüttelt. Wiederholte Extraktionen mit Dichlormethan (4 x 500 ml) beendeten die enzymatische Umsetzung. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand auf Kieselgel-Dickschichtplatten im Laufmittel H aufgetrennt. Neben nicht umgesetztem Tabersonin (R_f 0,65) und den Voafrinen A und B (R_f 0,5 und 0,45) erschienen jedoch als neue Produkte gelb gefärbte Alkaloidbanden ohne Fluoreszenz bei 360 nm (R_f 0,4 und 0,3). Diese ergaben mit CAS-Reagenz

besprüht ebenso blaue Zonen wie die anderen, erwarteten Verbindungen. Die neuen Reaktionsprodukte waren auf die erhöhte Tabersonin-Konzentration im Ansatz zurückzuführen; Inkubationen desselben Proteins mit der ursprünglichen, niedrigen Tabersonin-Menge lieferten wieder nur die im UV 360 nm fluoreszierenden Voafrine. Beim präparativem Ansatz war die polarste der neu aufgetretenen Verbindungen genauso wie die Voafrine nur zu je ca. 8 mg gebildet worden. Dagegen konnten die Hauptmengen an umgesetztem Alkaloid zu je ca. 130 mg von den jeweils knapp unter den Voafrinen liegenden, jedoch nicht fluoreszierenden gelben Banden eluiert werden.

2.2.1. Voafrin A und B als Referenzalkaloide für die Strukturaufklärung der Enzymprodukte

Zunächst wurde nur die Struktur dieser neuen Hauptprodukte untersucht. Das UV-Spektrum beider Verbindungen unterschied sich nicht von dem der Voafrine. Die EI-Massenspektren zeigten ebenfalls große Ähnlichkeiten, jedoch wurden größte Fragmente bei 669 m/z registriert. Bei der Aufnahme von Fast Atomic Bombardment Massenspektren mit Thioglycerin als Matrix addierte in beiden Fällen Thioglycerin an Einheiten mit eben dieser Masse.

Bei der Interpretation der Kernresonanz-Spektren dienten wiederum die bekannten Voafrine als Vergleich für die beiden neuen Produkte. Deshalb sei hier nochmals die Zuordnung der für die Verknüpfung der Tabersonyl-Einheiten wesentlichen Signale, wie sie bei PAWELKA (1985) erläutert wird, kurz aufgezeigt.

Verglichen mit Signalen für 4 Protonen am Ring D (2 H-3, 1 H-14 und 1 H-15) im Spektrum von Tabersonin erscheinen bei den dimeren Voafrinen nur insgesamt 6 Resonanzen (3 H-3,3', 1 H-14' und 2 H-15,15'). Die Verknüpfung 14,3' läßt sich dabei ableiten, weil durch den Bindungsschluß nun zwei Protonen fehlen und auch keine Kopplungen mit den ihnen benachbarten Wasserstoff-Atomen mehr zu beobachten sind. Für die Zuordnung wesentlich ist dabei die vicinale Kopplung von H-14 zu den H-3 einer Tabersonyl-Einheit. Bedingt durch den unterschiedlichen

Winkel, den H-3 α und H-3 β zur Ebene der Cyclohexen-Doppelbindung im Ring D des Tabersonin einnehmen, ist die Kopplungskonstante für H-14 zu H-3 β groß (5 Hz) und für H-3 α klein (2 Hz). So ist sowohl das Fehlen von H-14 wie auch die Stellung von H-3' aus dem NMR-Spektrum abzuleiten. Neben der chemischen Verschiebung oder dem Ausbleiben der entsprechenden Signale gibt das Auftreten der 5 Hz-Kopplung von H-3 β mit H-14 deutliche Hinweise. So zeigt Voafrin A (H-3'a) für H-3' eine kleine, Voafrin B (H-3' β) eine große Kopplung mit H-14'. Bei beiden steht für die Protonen am C-3 nur H-15 ($J \leq 2$ Hz) als Kopplungspartner zur Verfügung, da H-14 fehlt. Abbildung 19 erläutert diese Strukturelemente und die Auswirkungen auf das ^1H -NMR-Spektrum am Beispiel von Tabersonin und Voafrin A.

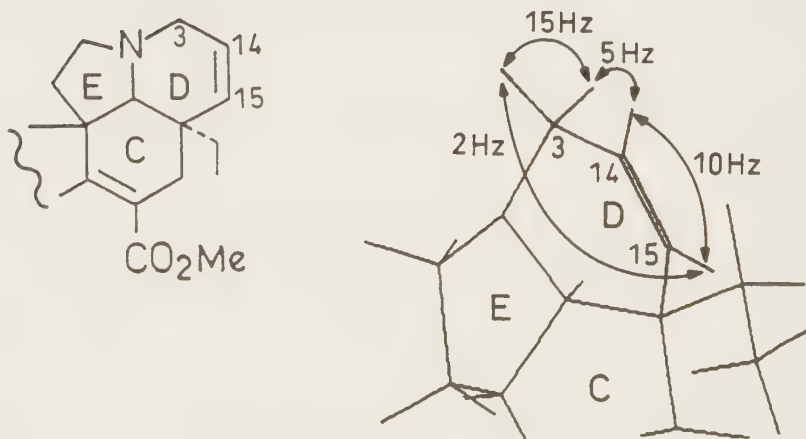


Abb. 19a: Kopplungen der Protonen der Voafrin-Verknüpfungs-Stelle am Tabersonin; die Kopplungen zwischen H-3 β und H-15 und H-3 α und H-14 sind ausgelassen.

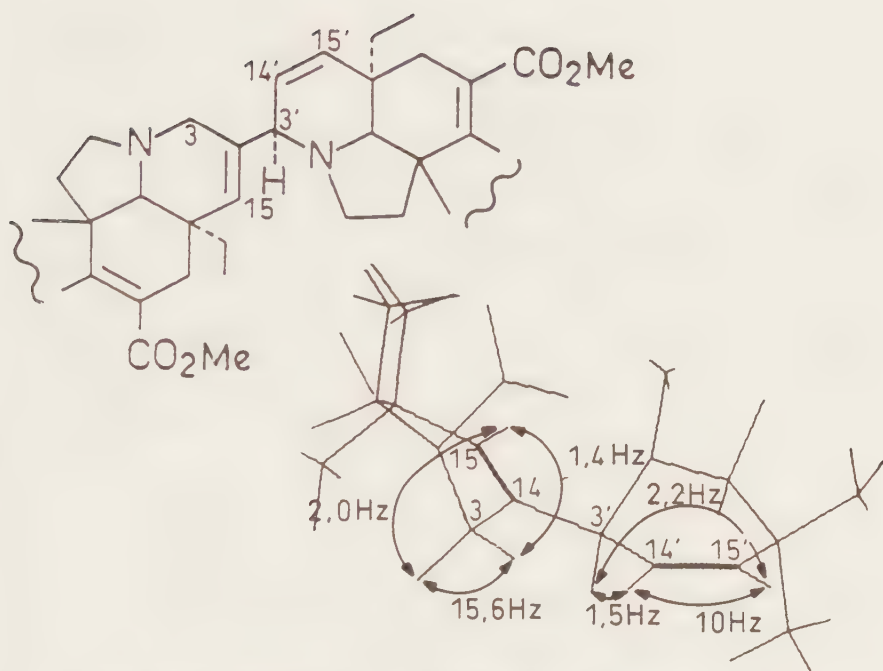


Abb. 19b: Kopplungen der Protonen an der Verknüpfungsstelle von Voafirin A; die Kopplungskonstanten für H-3'a sind nicht größer als 2,2 Hz

Die resultierenden Signale sind wie folgt nochmals zusammengefaßt; chem. Verschiebungen in ppm, Kopplungen in Hz:

	Tabersonin	Voafirin A	Voafirin B
H-3 α	3,44(ddd,15;2;2)	3,08(dd,15,6;2,0)	3,33(br,15,4;2,0)
H-3 β	3,16(ddd,15;5;1)	3,56(dd,15,6;1,4)	3,82(br,15,4)
H-3'a	--	3,76(ddd,2,2;1,5;1)	--
H-3' β	--	--	3,99(4,6;1,0;1)
H-14	5,78(ddd,10;5;2)	--	--
H-15	5,70(ddd,10;2;1)	5,76(ddd,2,0;1,4;1)	5,71(ddd,2,0;1;1)
H-14'	--	5,54(dd,10,0;1,5)	5,82(dd,10,2;4,6)
H-15'	--	5,75(dd,10,0;2,2)	5,93(dd,10,2;1,0)

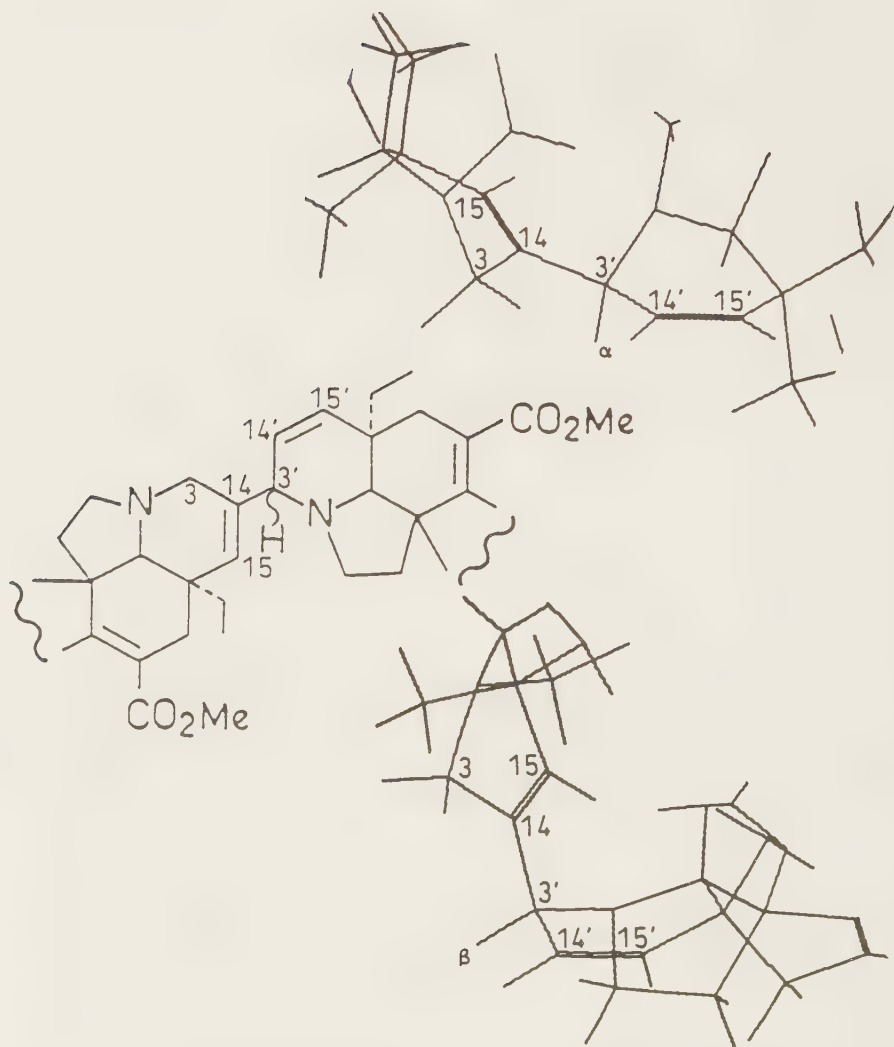


Abb. 20: Verknüpfungsstelle von Voafirin A (oben) und Voafirin B (unten).

Abbildung 20 zeigt die räumliche Anordnung bei der Verknüpfung der Voafrine A und B. Aus dieser sterischen Darstellung ist ersichtlich, daß die zweite Tabersonyl-Einheit einmal axial und einmal äquatorial zur Doppelbindungsebene des Ring D der ersten Einheit steht. Dadurch ergeben sich auch verschiedene bevorzugte Konformere für die beiden Voafrine. Voafrin A liegt in gestreckter, Voafrin B in gewinkelter Anordnung der beiden Tabersonyl-Einheiten vor (STÖCKIGT und Mitarbeiter, 1984).

Abbildung 21 demonstriert den Unterschied zwischen beiden Voafrinen, wenn man jeweils auf den Indolkern der ersten Tabersonyl-Einheit (1) blickt. Abb.22 führt die Blickrichtung auf die 3,14'-Verknüpfung von Voafrin B.

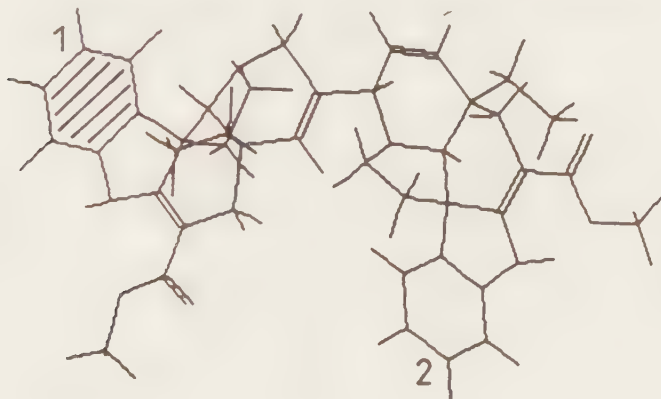


Abb. 21a: Gestreckte Konformation bei Voafrin A

Diese Konformere wurden mit dem Programm SYBYL (II.B.7.) mit der Funktion der Konformationsanalyse aufgefunden und als absolute Energieminima bestimmt. Dabei zeichnete der Rechner bei einer Drehung um die 14,3'-Bindung um 360° diejenigen Torsionswinkel auf, bei denen eine mögliche Konformation auch räumlich existieren kann.

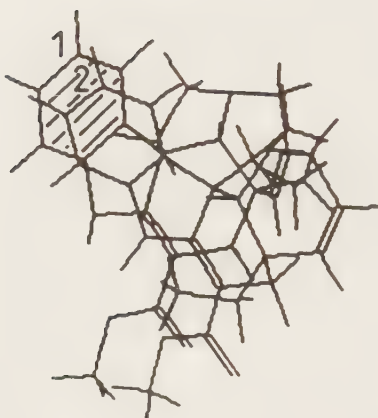


Abb 21b: Gefaltete Konformation bei Voafirin B



Abb 22: Voafirin B aus um 90° gedrehter Perspektive

Gleichzeitig wurde der Energiegehalt dieser gütigen Konformationen, wie hier für die absoluten Minima aufgelistet, berechnet (Ausgabe des Programms SYBYL):

Energy for molecule : Voafrine A

Bond Stretching Energy :	1.371
Angle Bending Energy :	27.925
Torsional Energy :	21.888
Out of Plane Bending Energy :	0.110
1-4 van der Waals Energy :	-5.818
van der Waals Energy :	-21.879
1-4 Electrostatic Energy :	-0.044
Electrostatic Energy :	0.145
=====	
Total Energy :	23.699 Kcal/mole

Energy for molecule : Voafrine B

Bond Stretching Energy :	1.610
Angle Bending Energy :	29.170
Torsional Energy :	27.479
Out of Plane Bending Energy :	0.295
1-4 van der Waals Energy :	>6.437
van der Waals Energy :	-22.905
1-4 Electrostatic Energy :	-0.220
Electrostatic Energy :	0.433
=====	
Total Energy :	29.423 Kcal/mole

Daß Voafrin B nur in der gewinkelten Konformation in Aceton und DMSO gelöst vorliegt, zeigen die unterschiedlichen Resonanzen gleicher Protonen beider Tabersonyl-Einheiten (PAWELKA, 1985). Bei Voafrin A (gestreckte Konformation, keine gegenseitige Beeinflussung der beiden Einheiten) kommen die Resonanzen übereinander zu liegen, Zuordnungen sind wesentlich schwieriger. Insofern überraschen die niedrigen berechneten Energiedifferenzen für Voafrin B in gestreckter Form (Torsionswinkel $14,3^\circ$ $\theta = 172^\circ$: 33,79 kcal/mol) zu gewinkelter Form ($\theta = 28^\circ$: 29,43 kcal/mol). Auch bei Voafrin A ist dieser Unterschied nicht größer ($\theta = 212^\circ$, gestreckt: 23,70 kcal/mol; $\theta = 50^\circ$, gewinkelt: 26,84 kcal/mol). Auf der Basis solcher absoluter Energieminima war das Vorliegen nur eines Konformeren in Lösung nicht zu verstehen. Ließ man jedoch eine systematische Analyse durchführen, bei der auf Existenzfähigkeit dieser Konformeren keine Rücksicht genommen wurde, errechnete sich eine beträchtliche Energiebarriere der freien Rotation um die 14,3'-Bindung. Bei Voafrin A betrug diese 5800 kcal/mol, bei Voafrin B 600 kcal/mol. Die Energiebarriere bei der freien Rotation von Ethan beträgt

beispielsweise nur 2,9 kcal/mol (MARCH, 1985). Diese Rotationsbarriere beruht auf den sterischen Bedingungen der Verknüpfungsstelle. Bei der Rotation überlappen sich die van der Waals-Radien der H-5' mit den der H-3 und H-19-Protonen, was sich gut in der Berechnung der ungünstigsten Konformere als Energie-Beitrag dieser Wechselwirkung wiederfinden läßt (Ausgabe des Programms SYBYL):

Energy for molecule : Voafrine A Conformer 146°

Bond Stretching Energy :	1.371
Angle Bending Energy :	27.925
Torsional Energy :	21.747
Out of Plane Bending Energy :	0.110
1-4 van der Waals Energy :	-6.187
van der Waals Energy :	5805.515
1-4 Electrostatic Energy :	-0.435
Electrostatic Energy :	1.059
=====	
Total Energy :	5851.104 Kcal/mole

Energy for molecule : Voafrine B Conformer 281°

Bond Stretching Energy :	1.610
Angle Bending Energy :	29.170
Torsional Energy :	27.844
Out of Plane Bending Energy :	0.295
1-4 van der Waals Energy :	-6.588
van der Waals Energy :	583.571
1-4 Electrostatic Energy :	-0.566
Electrostatic Energy :	0.958
=====	
Total Energy :	636.293 Kcal/mole

Abbildung 23 zeigt diese Rotationsbarrieren bei der Drehung der 14,3'-Bindungen um 360°. Das Vorliegen der Voafrine in jeweils unterschiedlicher Konformation muß also bereits beim Bindungsschluß festgelegt sein. Eine absolut energieärmste Anordnung könnte wegen der eingeschränkten Rotation nachfolgend nicht aufgefunden werden. Außerdem wären diese Konformere in gestreckter wie gewinkelter Form energetisch zu wenig unterschiedlich, um nur eine existierende Anordnung zu ergeben.

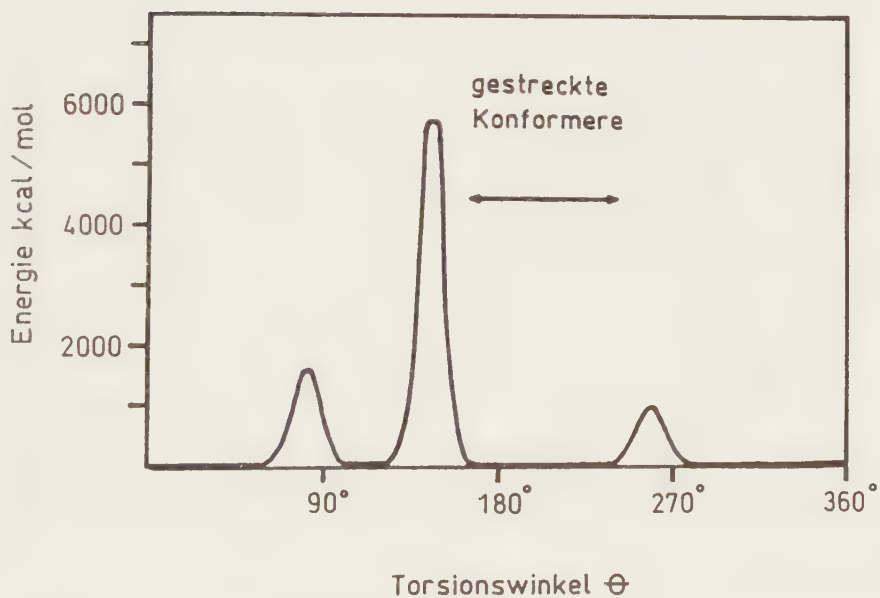
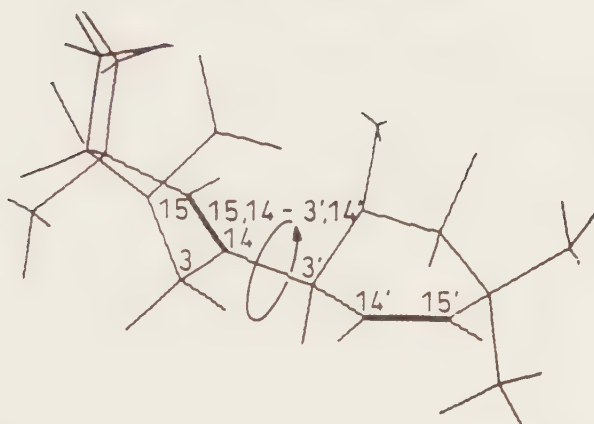


Abb. 23a: Energiebarriere bei der freien Rotation um die 3,14'-Bindung des Voafirin A

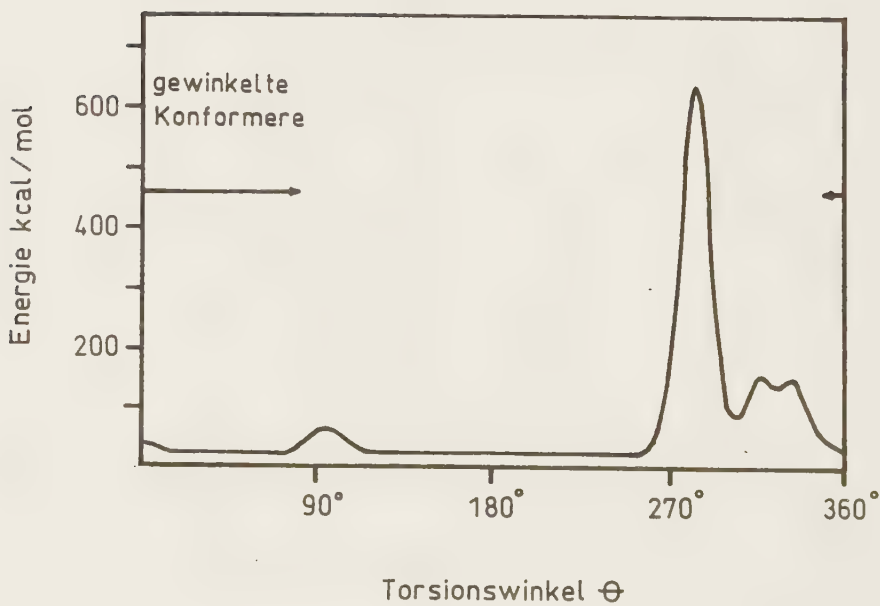
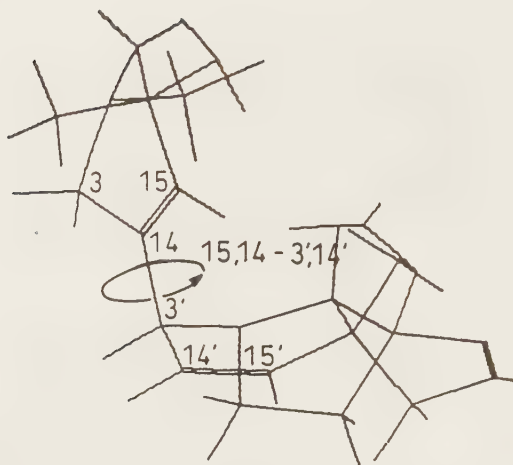


Abb. 23b: Energiebarriere bei der freien Rotation um die 3,14'-Bindung des Voafirin B

2.2.2. Untersuchungen zur Struktur der Hydroxy-Voafrine

Die beiden Produkte der präparativen enzymatischen Umsetzung zeigten ebenfalls die Voafrin-typischen Unterschiede in der Komplexität ihrer NMR-Spektren. Zur weiteren Untersuchung wurde deshalb das Produkt mit niedrigerem R_f -Wert und einfacherem Spektrum eingesetzt. Im Lösungsmittel Aceton, in dem auch die Voafrine vermessen worden waren, zeigte diese Verbindung jedoch paarweise auftretende Signale, z.B. 4 anstatt 2 NH und mehr als 8 aromatische H-Resonanzen. Das Produkt war jedoch chromatographisch nicht mehr weiter aufzutrennen. Beide im NMR-Spektrum zu beobachtende Verbindungen waren analog wie Voafrin B verknüpft, was an den jeweils paarweise auftretenden Signalen für H-14' (5,83 und 5,80 ppm; 2x dd, $J_1=10,1$ Hz, $J_2=4,7$ Hz), für H-15' (6,03 und 5,99 ppm; 2x dd, $J_1=10,1$ Hz, $J_2=1$ Hz) und für H-3' β (4,12 und 4,25 ppm, 2x dd, $J_1=4,7$ Hz, $J_2=1$ Hz) zu erkennen war. Auch das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte nur Signal-Paare. Aufschlußreich waren auch die ^1H -NMR-Signale für H-3 α und H-3 β . Nach den MS-Daten konnten aber nicht alle von den Voafrinen bekannten Protonen an ein und demselben Produkt vorhanden sein. Es mußte also ein Gemisch zweier epimerer Formen in Erwägung gezogen werden.

Auf Zugabe von D_2O verschwanden nicht nur die NH-Signale durch Austausch, auch war nur noch eine der epimeren Formen im Spektrum zu erkennen. Abbildung 24 zeigt den Bereich des ^1H -NMR-Spektrums für die aromatischen Protonen vor und nach Zugabe von D_2O . Mit D_2O blieb für die Protonen am C-3 alleine das Signal für H-3 β zurück. Die Gegenüberstellung der Daten für die 15-, 3 α - und 3 β -Wasserstoffe im Vergleich mit Voafrin B zeigt diesen Wandel:

	Voafrin B	Epimerengemisch	Zugabe von D_2O
H-15	5,71 ppm	5,65/5,62 ppm	5,60 ppm
H-3 α	3,33 ppm	5,07 ppm	--
H-3 β	3,83 ppm	5,44 ppm	5,42 ppm

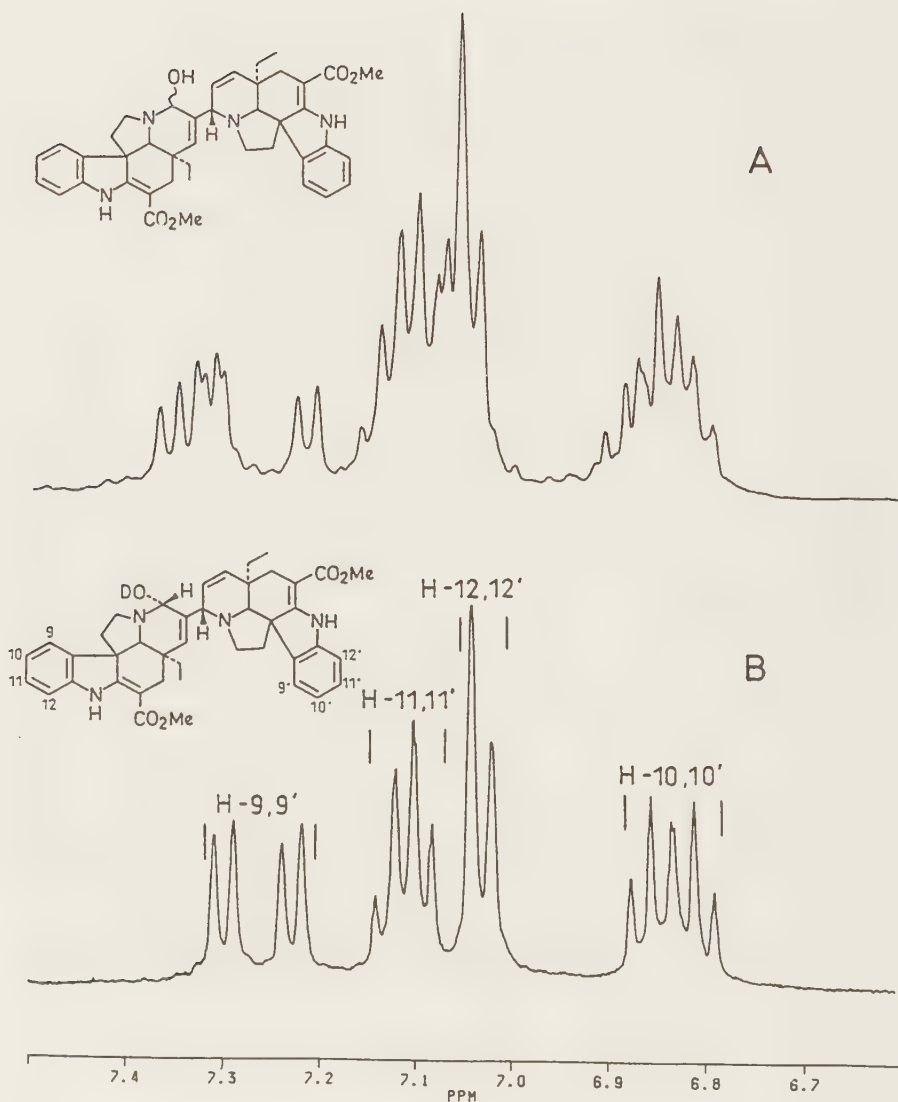


Abb. 24: Ausschnitt des ¹H-NMR-Spektrums für die aromatischen Protonen vor (A) und nach (B) Zugabe von D₂O. Die angegebenen Strukturen werden weiter unten diskutiert

Im Lösungsmittel DMSO konnte auch ein Signal für das Proton einer Hydroxylgruppe, daß mit H-3 β koppelt, beobachtet werden. Hier ist der Protonenaustausch der OH-Gruppen hinreichend langsam, um dieses Kopplungsmuster messen zu können (HESSE et al., 1984). In Aceton dagegen läßt sich nur eine Verschärfung des H-3 β -Signals registrieren, wenn D₂O zugegeben wird. Durch Austausch des Hydroxyl-Wasserstoffs mit Deuterium verschwindet dann auch noch die Restkopplung, die diese Resonanzlinie geringfügig verbreitert.

Damit war die große chemische Verschiebung gegenüber den C-3 Protonen der Voafrine nun durch eine Hydroxylgruppe in Stellung 3 zu erklären. Mit D₂O im Lösungsmittel DMSO verschwand sowohl die Resonanzlinie der 3 α -OH-Gruppe als auch die Kopplung von H-3 β und das H-3 α Signal (Abbildung 25).

Das H-3 α -Signal wird im Gegensatz zu dem von H-3 β nicht durch die entsprechende β -OH-Gruppe aufgespalten; diese erscheint auch nicht als Resonanzlinie. Beide Epimere müssen sich stark in ihren Konformationen unterscheiden, um die besprochene Unübersichtlichkeit im NMR-Spektrum zu erzeugen. Dies alles spricht für eine Wasserstoff-Brückenbindung der 3 β -OH-Gruppe zum N_b' der zweiten Tabersonyl-Einheit. Die 3 β -Hydroxylgruppe sollte dabei einen Torsionswinkel von ca. 90° zum H-3 α einnehmen.

Die Möglichkeit eines solchen Konformeren wurde wiederum mit dem Programm SYBYL überprüft. Die Energiebarriere für die freie Rotation des 3 α -OH-Epimeren betrug, durch die Hydroxylgruppe verstärkt, über 10.000 kcal/mol. Als absolut energieärmste Konformation ließ sich die gewinkelte Form mit 14,3'-Torsionswinkel $\theta = 13^\circ$ ermitteln.

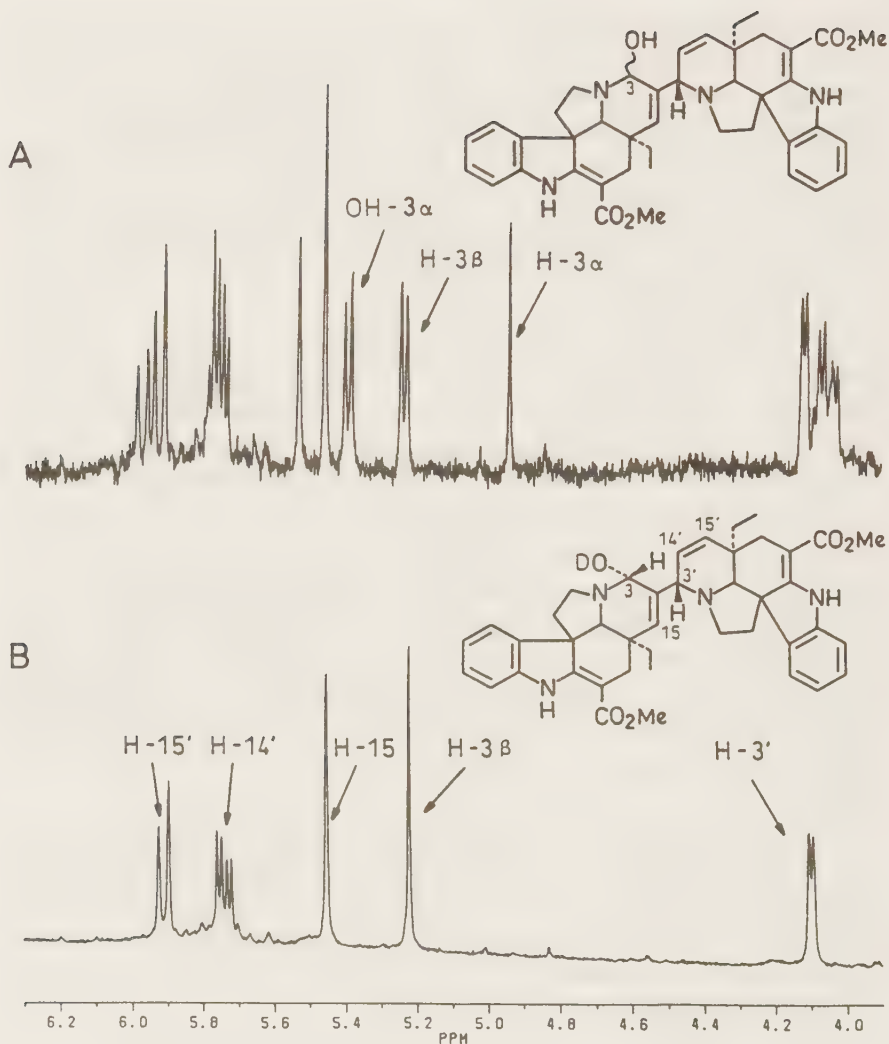


Abb. 25: Ausschnitt des NMR-Spektrums mit den Signalen für die Protonen am C-3. Vor Zugabe von D₂O (A) sind die Resonanzen von H-3 α , H-3 β und OH-3 α zu erkennen. Mit D₂O (B) bleibt das Signal für H-3 β zurück und wird durch OD-3 α nicht aufgespalten

Ausgabe des Programms SYBYL für dieses energieärmste Konformere:

Energy for molecule : 3 α -Hydroxy-Voafrine B

Bond Stretching Energy :	1.384
Angle Bending Energy :	26.679
Torsional Energy :	21.534
Out of Plane Bending Energy :	0.099
1-4 van der Waals Energy :	-7.306
van der Waals Energy :	-25.008
1-4 Electrostatic Energy :	-2.387
Electrostatic Energy :	0.820

=====

Total Energy : 15.816 Kcal/mole

Aber auch eine gestreckte ($\theta = 140^\circ$) Konformation war kaum davon zu unterscheiden (18,86 kcal/mol). Für das 3 β -OH-Epimere wurde die Möglichkeit einer Wasserstoff-Brückenbindung untersucht. Dazu wurde der Abstand zwischen dem Proton der 3 β -OH-Gruppe und dem Nb' der anderen Tabersonyl-Einheit aufgezeichnet. Der Torsionswinkel der 3 β -OH-Gruppe mit dem H-3 α war dabei, wie von den NMR-Daten her zu fordern, auf 90° festgelegt (Abb. 26).

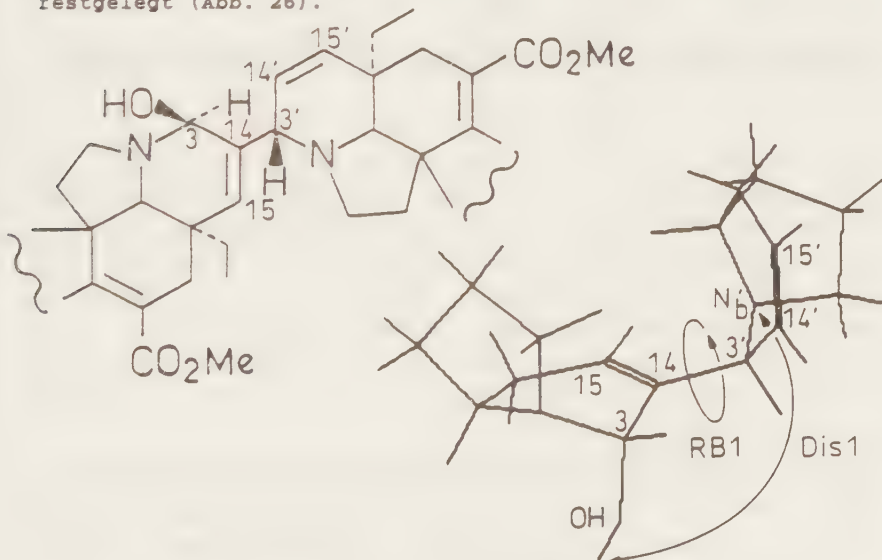


Abb. 26: Konformationsanalyse bei 3 β -Hydroxy-Voafrin B. Ermittelt wurden Torsionswinkel der 14,3'-Bindung (RB 1) sowie Abstand des Hydroxyl-Protons zum Nb' (Dis 1)

Bei stärkerer Annäherung der OH-Gruppe an den N_b'-Stickstoff muß dabei eine Deformation von van der Waals-Radien in Kauf genommen werden (Ausgabe des Programms SYBYL):

RB1	Energy	Dis1	Dabei bedeuten :
316.0	93.49	1.55	<u>RB1:</u> Torsions - Winkel
315.0	93.71	1.55	
317.0	95.41	1.55	der 14,3' -Bindung,
314.0	96.61	1.55	
318.0	99.15	1.65	<u>Energy:</u> Berechnete
357.0	42.78	2.35	(II.B.7) Konformeren-
1.0	28.65	2.45	Energie,
360.0	30.90	2.45	
359.0	33.86	2.45	
358.0	37.73	2.45	<u>Dis1:</u> Abstand von
6.0	23.51	2.55	Proton und Stickstoff
5.0	24.03	2.55	in Angström (Gekenn-
4.0	24.73	2.55	zeichnet in Abb. 26).
3.0	25.68	2.55	
2.0	26.96	2.55	
10.0	22.62	2.65	
9.0	22.72	2.65	
8.0	22.89	2.65	
7.0	23.15	2.65	
11.0	22.58	2.75	
12.0	22.58	2.75	
13.0	22.63	2.75	
14.0	22.72	2.75	
15.0	22.84	2.75	

Der Energiebetrag, der von der Wasserstoff-Brücke im Lösungsmittel DMSO zur Stabilisierung dieser energiereicheren Konformeren aufgebracht werden kann, muß also größer sein, als die Energiebarriere zu dieser Annäherung. Eine Aussage, wie diese Konformation auszusehen hätte, läßt sich auf Grund dieser Berechnungen aber nicht treffen. Bei Drehung des 3 α -OH-Epimeren um die 14,3'-Bindung waren jedenfalls keine Konformere mit einer Annäherung von 3 α -OH-Proton und N_b'-Stickstoff unter 3 Å zu beobachten.

Für eine α -Stellung der Hydroxylgruppe des in Gegenwart von D₂O stabileren Epimeren läßt sich neben der Lage des H-3 β Signals im Protonen-NMR auch das ¹³C-NMR-Spektrum anführen. Hier ist in DMSO das Signalpaar für die beiden C-3 weit voneinander entfernt, bei 85,5 und 77,2 ppm. Dies stellt wiederum einen großen Unterschied zur Lage des C-3 Signals

beim Voafrin B bei 52,9 ppm dar, der sich durch den Einfluß der 3-OH-Gruppe erklären läßt. Dabei entschirmt die β -ständige (quasiäquatoriale) Hydroxylgruppe stärker als die α -orientierte, quasiaxiale (Beispiele bei SHAMMA und HINDENLANG, 1979). Mit D₂O bleibt nur das Signal bei 77,2 ppm bestehen. Abbildung 27 zeigt einen Ausschnitt eines DEPT-Spektrums (II.B.6.2.), bei dem nur Resonanzen von tertiären Kohlenstoffen aufgezeichnet wurden.

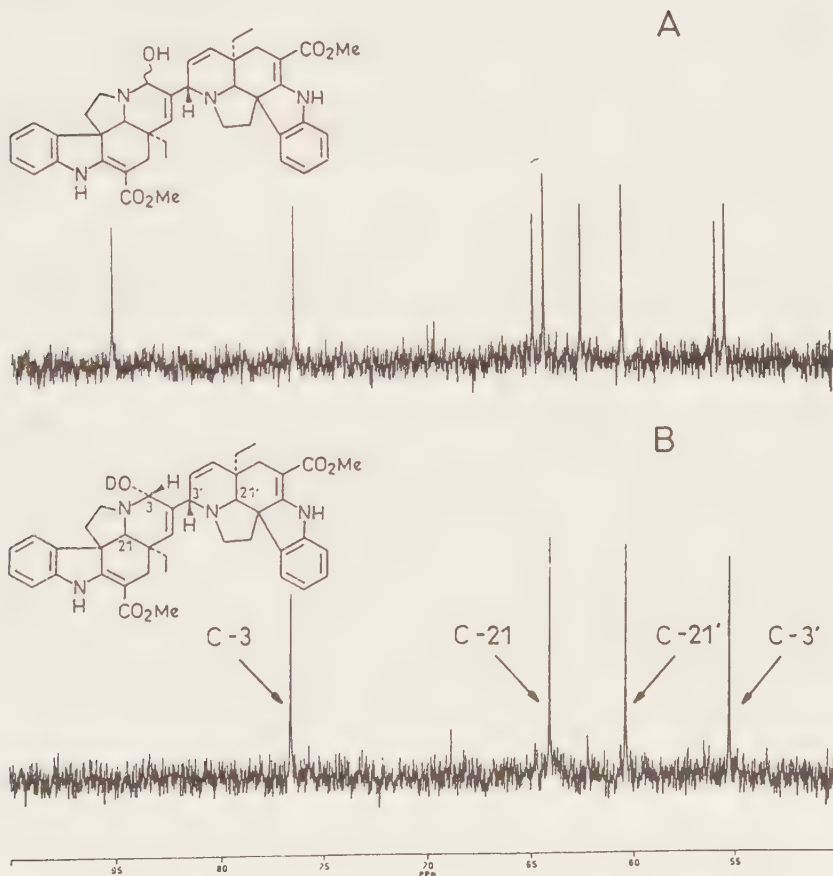


Abb. 27: Ausschnitt des DEPT ¹³C-NMR Spektrums von Hydroxy-Voafrin B vor (A) und nach (B) Zugabe von D₂O

Diese Daten sprachen zusammen für das Vorliegen von 3 α -Hydroxyvoafrin A und B als Produkte der präparativen enzymatischen Umsetzung. Zusätzliche Beweise gab noch die Reduktion dieser Verbindungen. Die mit Natriumborhydrid (II.B.1.2) resultierenden Alkaloide zeigten identische MS und NMR-Daten wie Voafrin A bzw. B. Wurden die Carbinolamine mit NaBD₄ zu den Voafrinen umgewandelt, war aus den Massenspektren der Einbau eines Deuterium-Atoms im Ring D einer der beiden Tabersonyl-Einheiten ersichtlich. Im ¹H-NMR-Spektrum verlor jeweils das H-3 β Signal seine geminale Kopplung, und die fehlende Resonanz von H-3 α zeigte eine Substitution durch Deuterium an. Dies belegt die α -Orientierung der Hydroxylgruppe bei beiden Verbindungen. Abbildung 28 veranschaulicht dies nochmals am Beispiel der Reduktion von 3 α -Hydroxyvoafrin A.

Neben der Reduzierbarkeit mit NaBH₄ ließ sich die Carbinolamin-Struktur durch Eliminierung der Hydroxylgruppe mit Trifluoressigsäure beweisen. Im ¹H-NMR-Spektrum von 3 α -Hydroxyvoafrin B in Aceton konnte auf Zugabe von Trifluoressigsäure das Iminium-Voafrin B beobachtet werden.

Dabei geben die stark nach tieferem Feld verschobenen Signale für H-3 (9,48 ppm), H-21 (4,9 ppm, long range Kopplung mit H-3) und den zwei H-5 (4,79 und 4,67 ppm) Gewißheit für das Vorliegen dieser Iminium-Form (Abbildung 29).

Die Bildung dieses reaktiven Iminium-Ions nach Verlust der OH-Gruppe erklärte auch das Verhalten der Hydroxyvoafrine bei der Massenspektroskopie (EI-MS: M⁺-OH als größtes Fragment; FAB-MS: Addition des Nukleophil Thioglycerol an die Iminiumform).

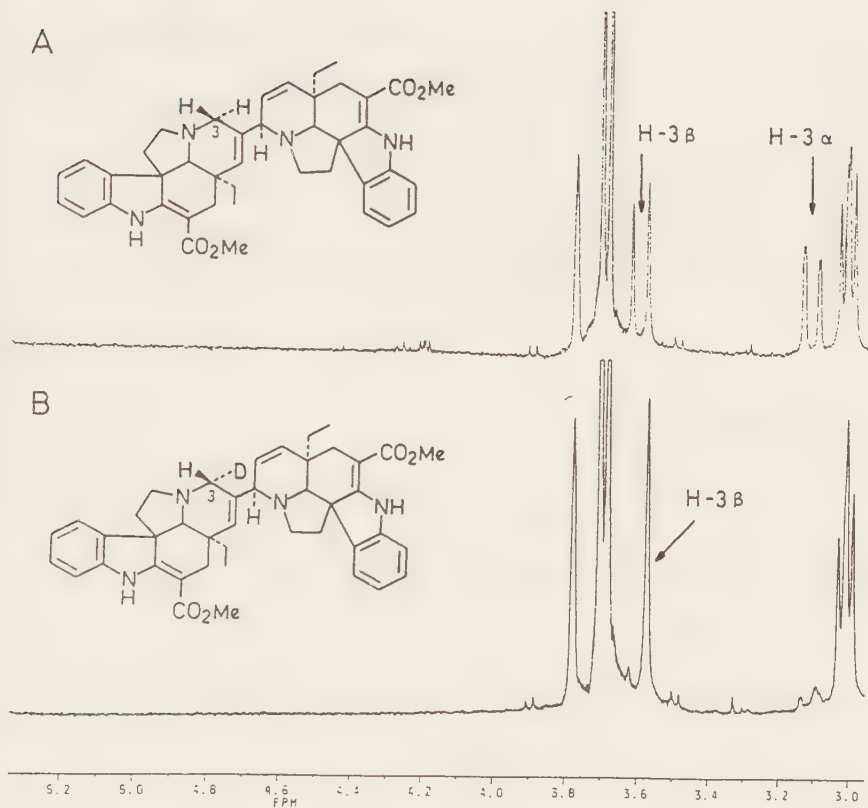
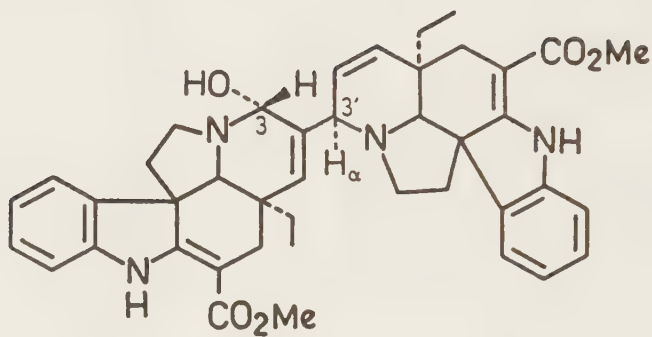
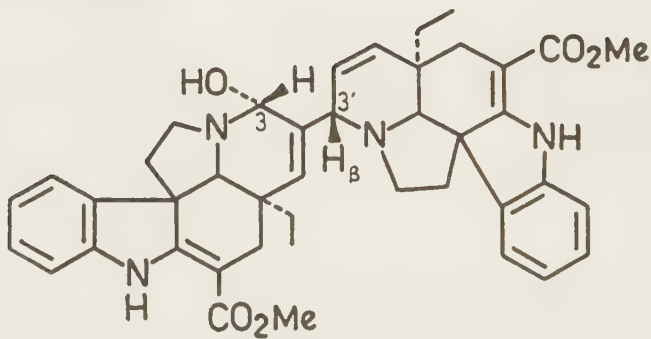


Abb. 28: Ausschnitt aus dem NMR-Spektrum der Reduktions-
produkte von 3 α -Hydroxy-Viofrin A mit NaBH₄ (A) und NaBD₄ (B).
D-3 α aus Reduktion mit NaBD₄ zeigt keine Resonanz, noch
koppelt das H-3 β Signal damit

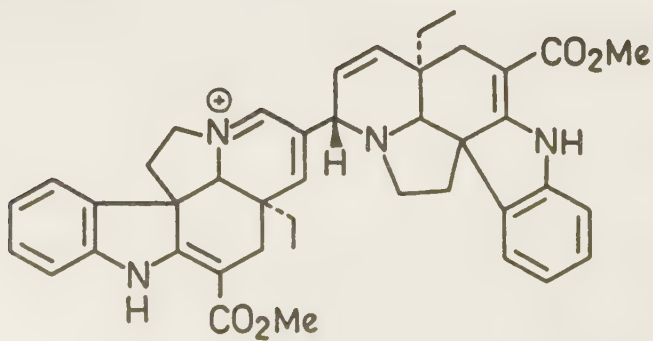
3 α -Hydroxy-Voafrin A.



3 α -Hydroxy-Voafrin B.



Iminium-Voafrin B.



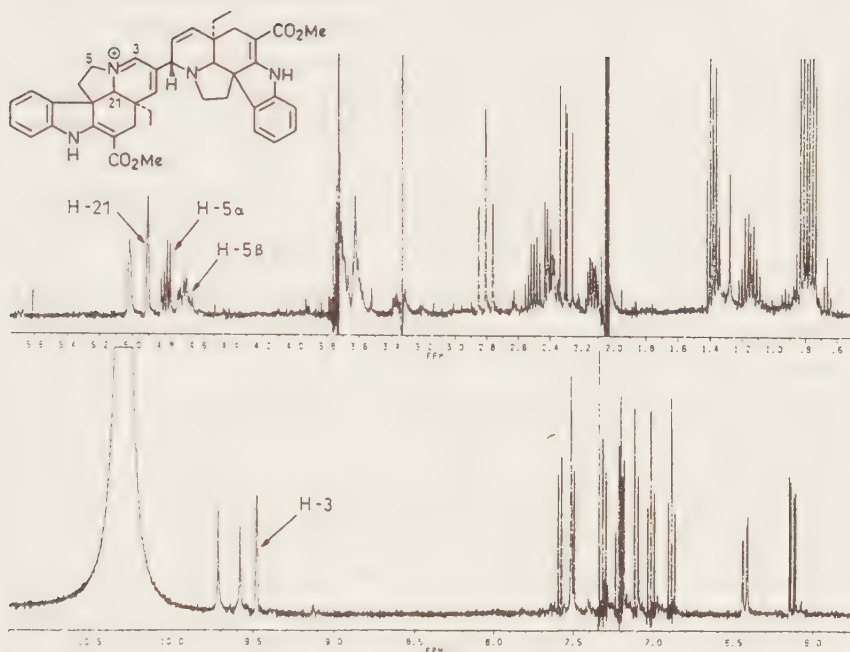


Abb. 29: Das ¹H-NMR-Spektrum von Iminium-Voafrin B in DMSO/TFA

2.3. Chemische und enzymatische Reduktion der Hydroxyvoafrine

Für Alkaloide mit Carbinolamin-Struktur ist die reduktive Entfernung der Hydroxylgruppe mit Natriumborhydrid (II.B.1.2) geläufig (vgl. ACHENBACH und RAFFELSBERGER, 1980). Mit dieser Methode konnten auch die Hydroxyvoafrine quantitativ in die Voafrine überführt werden. Somit wurde durch einen zweiten, chemischen Schritt die enzymkatalysierte Bildung der Hydroxyvoafrine im präparativen Maßstab zu den zunächst erwarteten Produkten Voafrin A und B weitergeführt. Diese dimeren Alkaloide waren damit erstmals in größeren Mengen zugänglich.

Die Aufarbeitung der Enzymsätze wurde vereinfacht, indem man die gebildeten Hydroxyvoafrine in einer Eintopf-Reaktion noch

in der wässrigen Proteinlösung reduzierte. Nach enzymatischem Umsatz von 200 mg Tabersonin-HCl (0,54 mmol) in 200 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 0,24 g Protein während 12 Stunden Sauerstoffzufuhr wurde die Inkubationsmischung mit Eisessig auf pH 4 eingestellt. Die nun klare Lösung versetzte man unter Schütteln portionsweise mit 0,5 g NaBH₄. Nach 12 Stunden erfolgte die Extraktion der Produkte aus dem mit K₂HPO₄ wieder neutralisierten Ansatz durch 2 x 200 ml Dichlormethan. Aus der organischen Phase konnte durch Chromatographie auf Kieselgel-Dickschichtplatten im LM H Voafirin A (42 mg) und Voafirin B (45 mg) in zusammen 47% Ausbeute erhalten werden.

Die Reduktion der Hydroxyvoafrine zu den Voafirinen war auch unter dem Aspekt der Biosynthese dieser Verbindungen in *Voacanga africana* bedeutungsvoll. Deshalb wurde Hydroxyvoafirin A (15 mg) mit 50 mg Protein aus *C. roseus* in einem Volumen von 20 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,0) inkubiert. An dieser Reaktion beteiligten sich 40 nkat Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 30 mg Glucose-6-phosphat (5 mM) und 10 mg NADP⁺ (0,5 mM). Nach 12 Stunden Schütteln bei 25 °C extrahierte man die Mischung mit Dichlormethan. Im Gegensatz zu einer Kontrollinkubation, die kein NADPH-regenerierendes System enthielt, konnten aus der organischen Phase 1,2 mg Voafirin A (8%) isoliert und spektroskopisch (MS, NMR) identifiziert werden.

2.4. Nebenprodukte der präparativen enzymatischen Tabersonin-umsetzung

Die dritte, aus Inkubationen (wie III.B.2.2.) isolierte gelbe Bande mit einem R_f-Wert von 0,1 (LM C) wurde im Laufmittel M nochmals weiter aufgetrennt. Ein Hauptprodukt (R_f 0,5; 8 mg) und weitere zwei, nicht gelb gefärbte Banden (R_f 0,4 und 0,2) mit je ca. 1 mg konnten so gewonnen werden. Wieder wurde zunächst das gelb gefärbte Hauptprodukt untersucht.

2.4.1. Untersuchungen zur Struktur eines Tabersonin-Trimeren

Bei diesem Produkt handelte es sich um eine weitere, wie die Hydroxy-Voafrine gelb gefärbte Verbindung aus dem

enzymatischen Ansatz. Vom UV-Spektrum her unterschied sich diese Substanz weder vom Tabersonin noch von den bisher erhaltenen Produkten. Im EI-Massenspektrum deutete ein größtes Fragment bei 769 m/z auf ein Additionsprodukt eines Hydroxy-Voafrins hin. Das Protonen-NMR-Spektrum in DMSO zeigte jedoch 3 NH-Gruppen und 12 aromatische Protonen, so daß auf ein Tabersonin-Trimeres zu schließen war. Nach Zugabe von D₂O verloren sich nicht nur die NH-Signale durch Austausch, sondern auch ein Dublett bei 5,47 ppm verschwand völlig, während ein ebensolches Signal bei 5,30 ppm seine Kopplung verlor. Mit den von 3 α -Hydroxyvoafrin B her bekannten Daten ließ sich daraus eine α -ständige Hydroxylgruppe an Stellung 3 einer dieser drei Tabersonyl-Einheiten ableiten:

	3 α -OH-Voafrin B	OH-Tabersonyl-Trimeres
H-3 β	5,24 ppm, d, J= 5,7 Hz	5,30 ppm, d, J= 6,6 Hz
OH-3 α	5,40 ppm, d, J= 5,7 Hz	5,47 ppm, d, J= 6,8 Hz
+D ₂ O (5% v/v):		
H-3 β	5,22 ppm, s	5,30 ppm, s

Nach den Erfahrungen mit den 3-OH-Voafrin-Epimeren wurde dieses Produkt aus Gründen der Stabilität und Übersichtlichkeit erst nach Reduktion mit Natriumborhydrid (II.B.1.2.) weiter untersucht. UV und auch IR-Spektrum waren wiederum mit den von den Voafrinen erhältlichen Werten identisch. Im Massenspektrum zeigte sich ein sehr schwaches Signal bei 1005 m/z (M⁺, <0,2%), genau so schwer, wie für ein Voafrin-homologes Trimeres berechnet. Ein deutlich erkennbares Fragment bei 775 m/z war 229 Masseneinheiten leichter als der Molekularpeak. Dieses 229-Fragment war auch im Spektrum deutlich auszumachen (60% rel. Int.) und war noch ein zweites Mal abgespalten worden, woraus ein Fragment mit 546 m/z resultierte. Verglichen mit Voafrin B sind dort ebenfalls die Bruchstücke 229 m/z und M⁺ -229 (441 m/z) zu erkennen.

Weitere Hinweise auf die Struktur dieses Tabersonin-Trimeren waren dem ^1H -NMR-Spektrum zu entnehmen. Wieder waren deutlich 3 NH-, CO_2CH_3 - und CH_3 -18-Gruppen zu erkennen. Abbildung 30 zeigt die entsprechenden Ausschnitte eines 600 MHz-Spektrums.

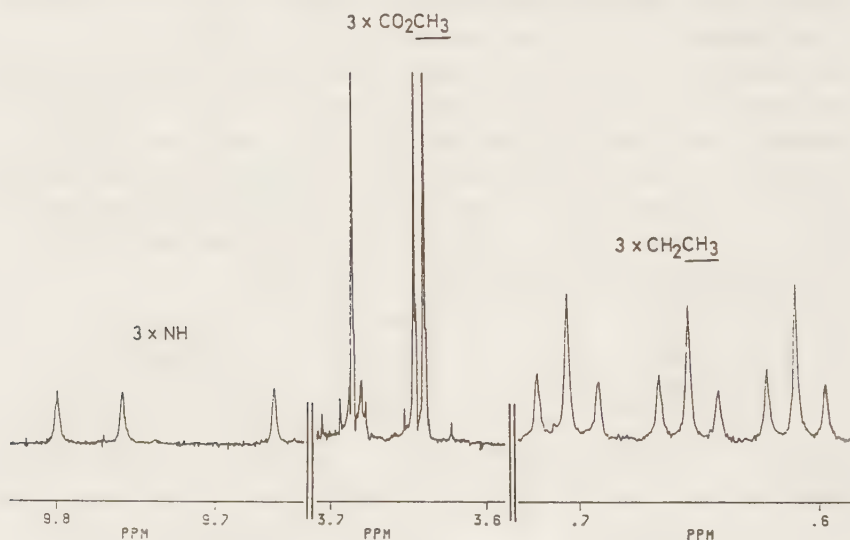


Abb. 30: Ausschnitte aus dem 600 MHz ^1H -NMR-Spektrum des Tabersonin-Trimeren, gemessen in DMSO

Weiterhin bewies das Vorhandensein von 12 aromatischen Protonen im Bereich von 7,4 - 6,87 ppm, daß ein Tabersonin-Trimere vorlag. Zwei weitere Resonanzen bei 6,0 und 5,77 ppm, die wiederum untereinander vicinale Kopplung aufwiesen, koppelten mit einem Signal bei 3,82 ppm. Dieses ABX-System entsprach genau den Signalen der Verknüpfungsstelle von Voafirin B. Zwei geminal koppelnde Protonen waren gegenüber dem nicht reduzierten Carbinolamin neu hinzugekommen. Das α -Proton, das an dieser Stelle die Hydroxyl-Gruppe ersetzt hatte, koppelte erkennbar mit einem Signal bei 5,45 ppm. Eine vicinale Aufspaltung durch ein Wasserstoff-Atom in Stellung 14 war für diese Protonen nicht festzustellen. Bis hierher waren also große Ähnlichkeiten mit Voafirin B zu verzeichnen (chem. Verschiebungen in ppm, Kopplungen in Hz):

	Voafrin B		Tabersonin-Trimeres
H-3'β	3,99 (d; 4,6)		3,82 (d; 4,5)
H-14'	5,82 (dd; 10,2, 4,6)		5,77 (dd; 10,3, 4,6)
H-15'	5,93 (dd; 10,2, 1)		6,00 (br d; 10,4)
H-3α	3,33 (d; 15,4)	H-3''α	3,45 (d; 15,6)
H-3β	3,82 (d; 15,4)	H-3''β	3,90 (d; 15,7)
H-15	5,76 (br s)	H-15''	5,45 (br s)

Neu hinzu kamen jedoch zwei miteinander koppelnde Signale bei 5,78 und 4,34 ppm. Ersteres war unschwer einem H-15 zuzuweisen (5,71 ppm im Voafrin B). Das zweite Signal entsprach folgerichtig dem einzelnen H-3 an der Verknüpfungsstelle für die dritte Tabersonyl-Einheit. Dies würde in einem 600 MHz COSY-Experiment (II.B.6.2.), bei dem auf long range Kopplungen abgestellt war, durch Kopplungen dieses H-3 Protons mit H-15, H-3', H-3''α, H-3''β, und H-15'' belegt (Abb. 31).

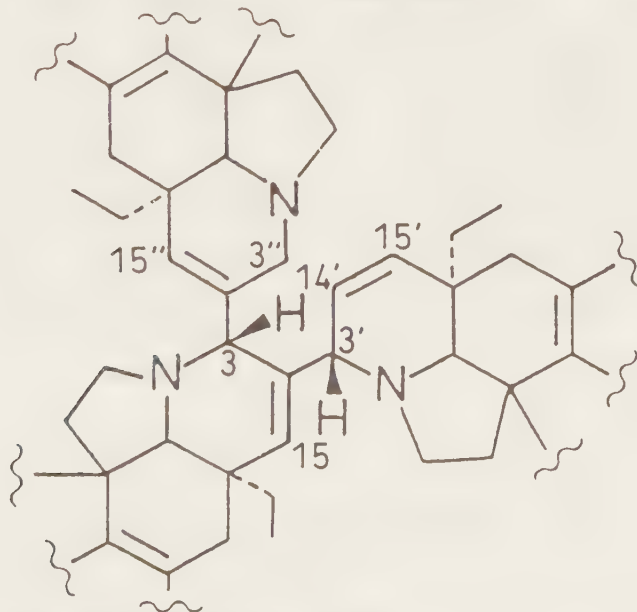


Abb. 31a: Verknüpfungsstelle des Tabersonin-Trimeren

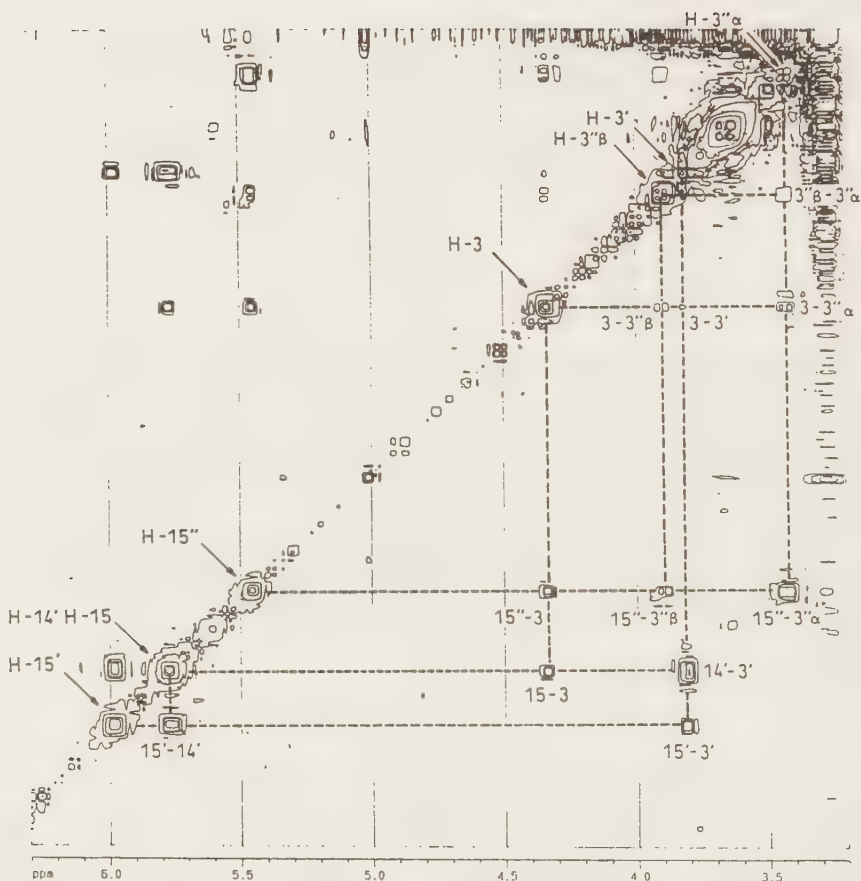


Abb. 31b: 600 MHz long range COSY-Spektrum der Verknüpfungsstelle des Tabersonin-Trimeren

Demnach handelte es sich um ein 3-(14''-Tabersonyl)-Voafrin B. Dabei ließ sich die Verknüpfung 14,3' β eindeutig analog Voafrin B festlegen. Die dritte Tabersonyl-Einheit wiederum war am wahrscheinlichsten von der sterisch begünstigten (III.B.2.6.3) 3 α -Position addiert worden. Mit dem Programm SYBYL wurde dazu eine systematische Konformer-Suche durchgeführt (II.B.7.). Während für das in 3 α -verknüpfte Tabersonyl-Voafrin B insgesamt 42 Konformere als möglich errechnet wurden (Abb. 32), konnte für das 3 β -Epimere keine

existenzfähige räumliche Anordnung gefunden werden. Auch 3-Tabersonyl-Voafrine A konnten so nicht in eine mögliche Konformation gebracht werden.

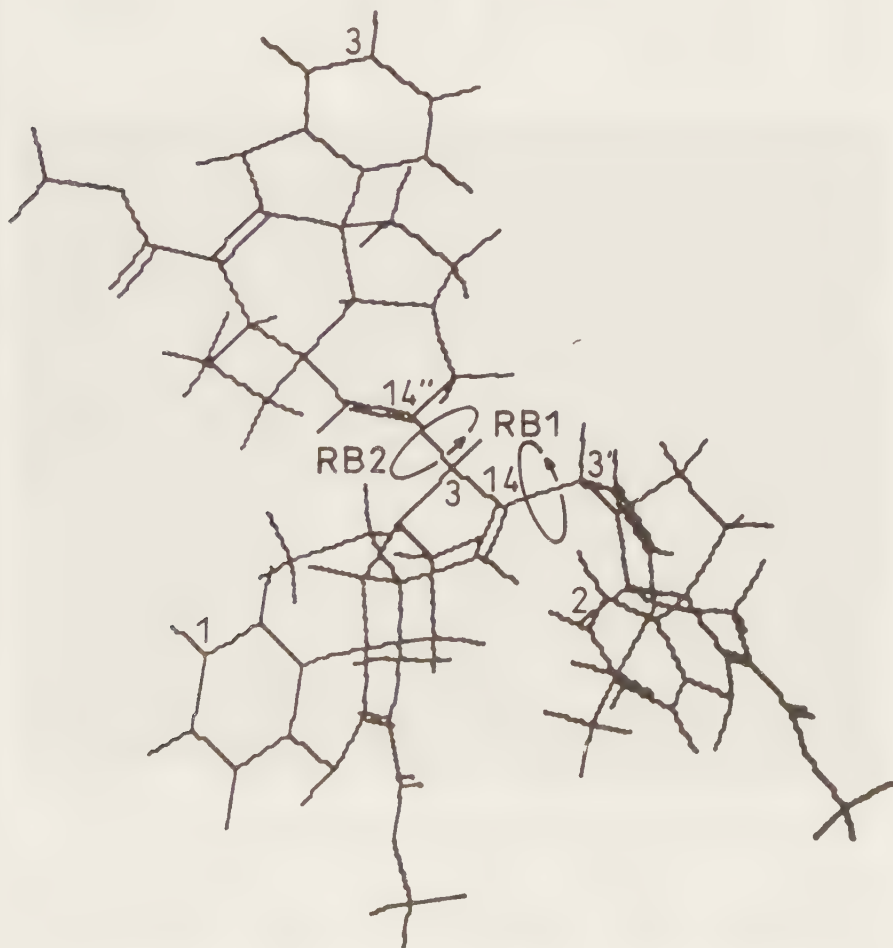


Abb. 32: Konformationsanalyse für 3 α -Tabersonyl-Voafrin B. Existenzfähige Konformere besitzen Torsionswinkel für RB 1 von 26-28°, für RB 2 von 138-151°

Darüber hinaus würde die so für 3 α -Tabersonyl-Voafrin B errechnete Anordnung der drei Tabersonyl-Einheiten gegenseitig

gewinkelt sein. Dies wäre analog dem Voafrin B und würde durch die gute Auftrennung der Signale der monomeren Einheiten im ^1H -NMR-Spektrum des Tabersonin-Trimeren unterstützt.

Diese Anhaltspunkte lassen nur den Schluß zu, daß es sich bei diesem Tabersonin-Trimeren um 3α -(14''-Tabersonyl)-Voafrin B handelt (Abb. 33).

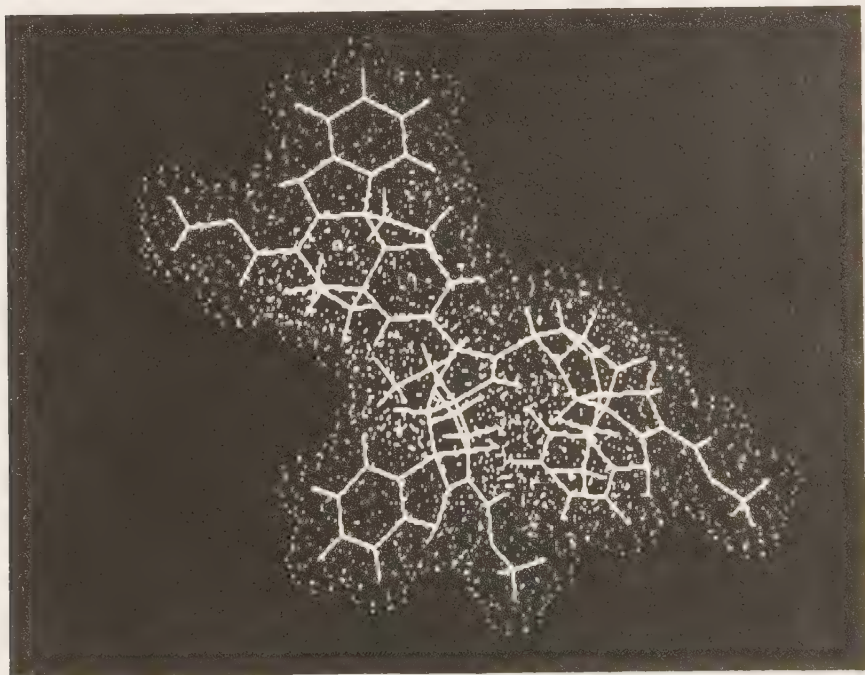
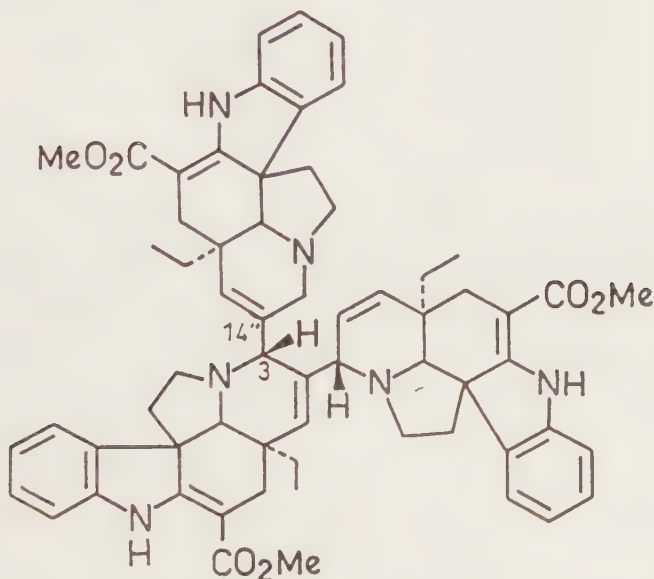


Abb. 33: SYBYL-Darstellung von 3α -Tabersonyl-Voafrin B. Die van der Waals-Raumerfüllung der Atome ist gekennzeichnet

Tetramere aus Tabersonin konnten in Enzymansätzen mit *C. roseus*-Protein nicht aufgefunden werden. Eine Konformations-Analyse mit dem Programm SYBYL ergab keine existenzfähige Anordnung einer weiteren homolog verknüpften Tabersonyl-Einheit.

3 α -(14''-Tabersonyl)-Voafrin B.



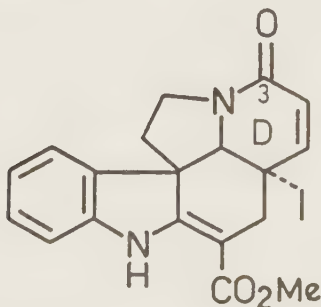
2.4.2. Strukturen von höher oxidierten Nebenprodukten

Das zweite, vom 3 α -Tabersonyl-Voafrin B abgetrennte Produkt (R_f 0,2; LM M) ließ sich vom Massenspektrum her als monomeres Tabersonin-Derivat identifizieren. Der Molekülpeak von 350 m/z (Tabersonin + 14 m/z) sowie die weiteren Fragmentierungen zeigten eine Ketogruppe im Ring D an. Folgerichtig fehlten im ^1H -NMR-Spektrum die Signale für beide Protonen am C-3, und die H-15,5,21-Signale waren im Vergleich zu Tabersonin zu tieferem Feld verschoben. Am deutlichsten war dies beim H-15 Signal durch den vinylogenen Elektronen-Zug der 3-Ketogruppe, wie auch analog für 3 α -Cyanotabersonin beobachtet (III.B.2.6.3.). Dagegen wird H-14 benachbartes Proton durch die Anisotropie der Carbonylgruppe eher abgeschirmt und ist kaum gegenüber dem entsprechenden Signal von Tabersonin verschoben. Diese Daten sind zum besseren Überblick gegenübergestellt:

	Tabersonin	3-Oxotabersonin	3 α -Cyanotabersonin
H-14	5,78 ppm (ddd)	5,83 ppm (d)	5,86 ppm (dd)
H-15	5,70 ppm (ddd)	6,57 ppm (d)	5,95 ppm (dd)
H-5 α	3,02 ppm (m)	4,08 ppm (m)	3,06 ppm (m)
H-5 β	2,88 ppm (m)	3,30 ppm (m)	2,79 ppm (m)
H-21	2,63 ppm (d)	3,98 ppm (d)	2,85 ppm (d)

Diese Zuordnungen stehen im Einklang mit den Daten von AIMI et al. (1978), die 3-Oxotabersonin aus Samen von *Amsonia elliptica* isolieren konnten. In CDCl₃ wurde für H-14 ein Signal bei 5,94 ppm, für H-15 bei 6,44 ppm beobachtet.

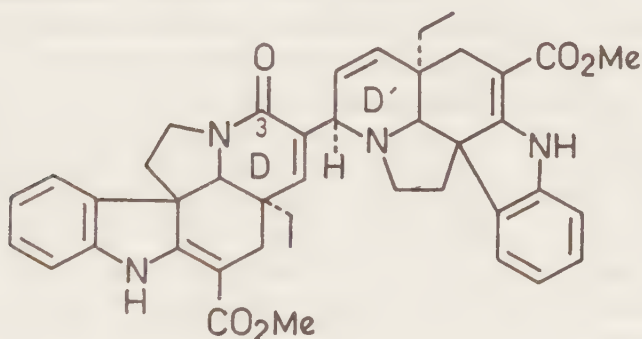
3-Oxo-Tabersonin.



Die dritte Bande mit R_f 0,4 im LM M war dem Massenspektrum nach wieder ein Tabersonin-Dimeres. Das größte Fragment bei 684 m/z (Voafrin + 14 Masseneinheiten) ließen mit der übrigen Fragmentierung auf eine Keto-Funktion in einem der beiden D-Ringe schließen. Das Protonen-NMR-Spektrum zeigte eine Voafrin A -typische Verknüpfung mit einem H-3' α -Signal ohne große Kopplung mit H-14'. Die Signale für H-3 fehlten wie beim 3-Oxo-Tabersonin. Ebenso waren wie beim 3-Oxo-Tabersonin die Resonanzen für H-15, H-21 und H-5 α stark zu tiefem Feld verschoben:

	Voafrin A	3-Oxo-Voafrin A	3-Oxo-Tabersonin
H-3 α / β	3,08/3,56 ppm	----	----
H-15	5,76 ppm	6,44 ppm	6,57 ppm
H-21	2,73 ppm	3,96 ppm	3,98 ppm
H-5 α	2,70 ppm	4,19 ppm	4,08 ppm

3-Oxo-Voafrin A.



3-Oxo-Tabersonin und -Voafrin A waren nur in Spuren bei der enzymatischen Umsetzung von Tabersonin aufgefunden worden. Eine spontane Bildung durch Luftsauerstoff erscheint denkbar. Die Verknüpfung ist sowohl vor als auch nach dieser Oxidation plausibel, wenn man die Reaktion des Cyano-Tabersonin mit Iminium-Tabersonin (III.B.2.7.3.) in Betracht zieht.

2.5. Anreicherung der Tabersonin-verknüpfenden Enzymaktivität

Zur Bearbeitung von Fragestellungen, mit welchen und wievielen Enzymen die Bildung der Tabersonin-Dimere und Trimere vonstatten geht, war zunächst eine Anreicherung der entsprechenden Enzymaktivität aus dem Proteinextrakt notwendig.

2.5.1. Enzymtest für die Tabersonin-Umwandlung

Aus der enzymatischen Umsetzung von Tabersonin resultierten, wie oben ausgeführt, verschiedene Reaktionsprodukte. Die Zusammensetzung dieses Gemisches war abhängig von der Konzentration des Tabersonin im Ansatz. Da bei Substrat-

sättigung gearbeitet werden sollte, waren sowohl die Bildung von Hydroxyverbindungen als auch nicht hydroxylierte Dimere und Trimere von Tabersonin zu berücksichtigen. Anstatt die Summe der Reaktionsprodukte, die alle aus der Oxidation von Tabersonin resultierten, berechnen zu müssen, wurde als Maß für die Enzymaktivität die Abnahme der Tabersonin-Menge genommen. Diese quantitative Auswertung erfolgte durch HPLC-Auftrennung im oben beschriebenen System (siehe II.B.3.2.). Dadurch war es möglich, jeweilige spezifische Aktivitäten für die Tabersonin-Umsetzung auf Proteinbasis anzugeben.

Zu 0,5 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 mit ca. 1 nkat Enzymaktivität wurden 0,2 mg Tabersonin·HCl (540 nmol) in 10 µl Methanol gegeben und die umgeschüttelte Mischung für 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend extrahierte man die Ansätze mit 0,4 ml Ethylacetat und engte 250 µl der organischen Phase ein. Der Rückstand ließ sich in 1 ml Methanol aufnehmen und 20 µl von dieser Lösung zur HPLC injizieren.

Um die Enzymaktivität im Laufe der Anreicherung wieder aufzufinden, war jedoch nur ein vereinfachter, qualitativer Test nötig. Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden zu 100 µl mit 100 µg Tabersonin·HCl versetzt, Sauerstoff in das Reaktionsgefäß geleitet und umgeschüttelt. Während der Inkubation bei 30 °C konnte bei entsprechend hohen Aktivitätsmengen bereits die Enzymtätigkeit visuell durch Gelbfärbung (Hydroxy-Verbindungen) der trüben Ansätze erkannt werden. Ansonsten wurden die Tests nach zwei Stunden mit Essigester extrahiert und über DC im LM C aufgetrennt. Detektieren ließ sich die Enzymaktivität hier neben verminderter Fluoreszenzlöschung der Tabersonin-Zone durch ein Reaktionsprodukt mit R_f 0,1, das durch Addition des als Oxidationsschutz für das Protein anwesenden Dithioerythrit (1 mM) an das Tabersonin entstand. Weiterhin waren mit höheren Enzymaktivitäten wiederum die Hydroxyvoafrine als Indikatoren für die enzymatische Oxidation auszumachen.

2.5.2. Proteinextrakt aus *C. roseus*-Blättern

1 kg Blätter wurden unter Stickstoff eingefroren, mit 0.5 l Tris·HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5), 1 mM EDTA und 20 mM MSH aufgetaut. Den so erhaltenen Brei filtrierte man ab und unterwarf das Filtrat für 20 Minuten einer Zentrifugation bei 20.000 g. Aus dem Überstand wurde eine Protaminsulfat-Fällung durchgeführt. Dazu folgte der Zugabe von 1,2 g Protaminsulfat in 60 ml Puffer ein weiterer Zentrifugationsschritt. Aus diesem Überstand wurde zuerst mit 40% Ammoniumsulfat-Sättigung, und, nach Abtrennung dieses Niederschlags bei 20.000 g, mit 80% Sättigung an Ammoniumsulfat Protein ausgefällt. Das Präzipitat der zweiten Salzfraktionierung wurde wiederum abzentrifugiert. Es ließ sich anschließend in ca. 30 ml Aufschlußpuffer wieder in Lösung bringen. Dieser Proteinextrakt wurde über Sephadex G 25 Säulen, vorgespült mit 20 mM Tris·HCl pH 7,5 und 1 mM DTE, entsalzt.

2.5.3. Chromatographische Schritte zur Anreicherung der Tabersonin-dimerisierenden Enzymaktivität

Die so erhaltene Proteinlösung wurde mit 20 ml/h auf eine Procion Red H-3B substituierte Fraktogel TSK HW 65 F Säule (II.B.2.1.) der Abmessung 2,6 x 50 cm aufgegeben. Elution der Enzymaktivität erfolgte mit einem Kaliumchlorid-Stufengradienten. Eine Tabersonin-Umsetzung konnte in Eluat mit 1-2 M KCl festgestellt werden. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und auf 40% mit Ammoniumsulfat gesättigt. Diese Lösung pumpete man mit 20 ml/h über eine Octyl-Sepharose-Säule (1 x 10 cm). In 4 weiteren Stunden bei dieser Flußrate wurde die Salzkonzentration im Puffer auf 0% Ammoniumsulfat linear erniedrigt und parallel dazu Ethylenglykol bis 25% (v/v) zugegeben. Die Enzymaktivität wurde im letzten Drittel des Gradienten von der Säule desorbiert. Diese Fraktionen ließ man vereint gegen 20 mM Tris·HCl pH 8,2, 1 mM DTE, dialysieren. Anschließend band das Protein an einen starken Anionenaustauscher. Hierzu gab man das Dialysat mit 50 ml/h über eine Säule (1,6 x 20 cm) mit Q-Sepharose fast flow. Zur Elution wurde die Kaliumchlorid-Konzentration im Puffer über 4 Stunden gleichmäßig auf 1 M KCl gesteigert. Die Enzymaktivität ließ

sich in der Mitte des Gradienten eluieren. Die so gewonnene Enzymlösung wurde im Dialyseschlauch gegen Polyethylenglykol 20.000 eingeeengt und über eine Gelfiltrations-Säule weiter gereinigt. Eine FPLC-Säule (1,6 x 50 cm) mit Superose 12 trennte diese Anreicherungsstufe mit 0,2 ml/h betrieben in 2 Proteinpeaks auf. In Abbildung 34 ist dieses Elutionsprofil zu ersehen, aus Abb. 35 kann man das ermittelte Molekulargewicht von ca. 42.500 entnehmen.

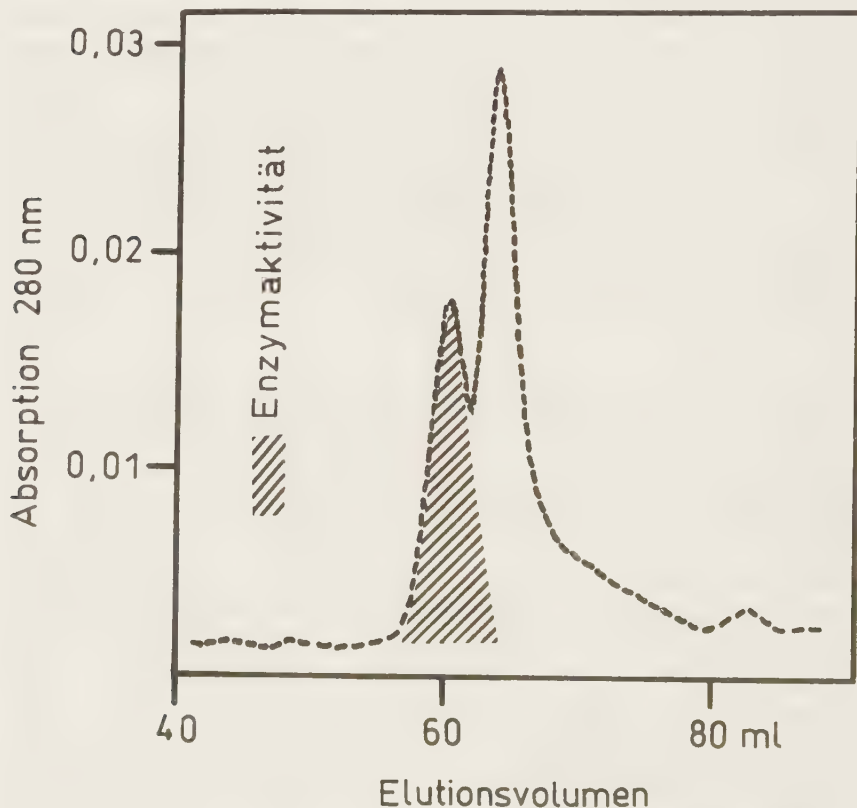


Abb. 34: Elutionsprofil von Protein mit Dimerisierungs-Aktivität in der FPLC-Gelchromatographie

Auch bei Chromatographie über eine Fraktogel TSK HW 65 S Säule (2,6 x 95 cm) resultierte mit einer Flußrate von 4 cm/h die gleiche Auflösung und gleiches Molekulargewicht. Dort dauerte

die Chromatographie 14 Stunden gegenüber 7 Stunden an der nur eingeschränkt präparativ nutzbaren FPLC-Säule.

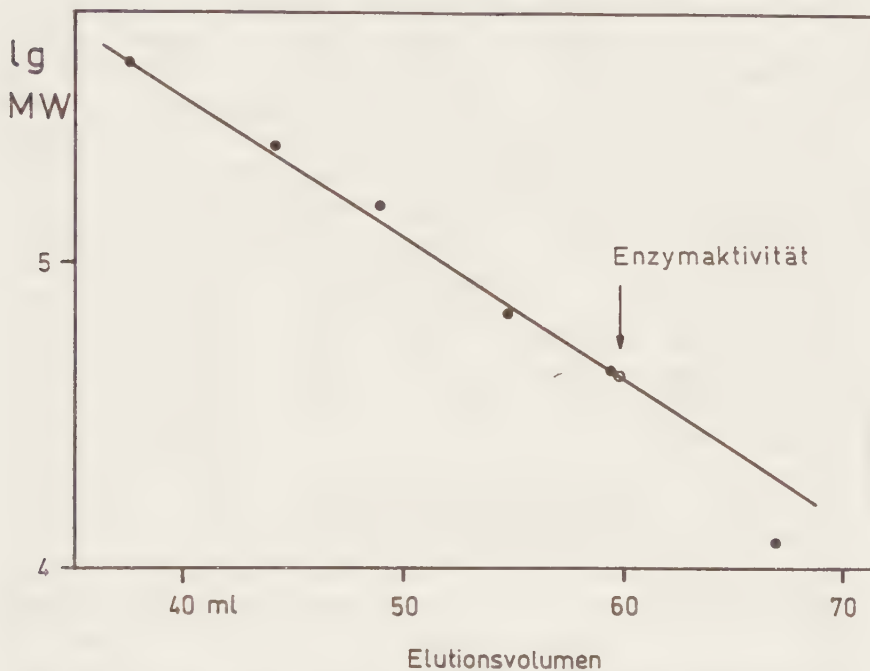


Abb. 35: Molekulargewichtsbestimmung der für die Dimerisierung verantwortlichen Enzymaktivität

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die so erzielte, 250-fache Anreicherung.

2.5.4. Isoelektrische Fokussierung

Neben dem Molekulargewicht sollte noch der isoelektrische Punkt des an der Oxidation von Tabersonin beteiligten Enzyms zur Charakterisierung ermittelt werden. Aus 100 g Blättern von *C. roseus* wurde mit 50 ml Tris·HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5), der 1 mM EDTA, 100 µg Leupeptin und 1,7 mg Phenylmethylsulfonylfluorid (in 200 µl Aceton gelöst) enthielt, wie bei III.B.5.2. ein Rohextrakt hergestellt.

Tabelle 1: Anreicherung der Dimerisierungs-Enzymaktivität

Reinigungsstufe:	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	spez. Akt./Ausbeute nkat/mg / %
Protaminsulfat- überstand	1040	0,75	0,8 /100
Ammoniumsulfat- fällung	110	1,84	nicht bestimmt
Farbstoff- Chromatographie	31,5	0,51	nicht bestimmt
Hydrophobe Chromatographie	52	1,82	nicht bestimmt
Ionenaustausch- Chromatographie	65	0,04	nicht bestimmt
Gelfiltrations- Chromatographie (Fraktogel TSK HW 55 S)	23	0,05	207 /38

Dieser Extrakt wurde durch Gelfiltration (Sephadex G 25) in eine 2 mM DTE-Lösung überführt. Mit dieser salzfreien Proteinpräparation wurde ein granuliertes präparatives Gel (II.B.5.4.) gegossen und der pH-Gradient von 4-6 mit 12.000 Voltstunden ausfokussiert. Aus Gelstreifen mit den pH-Werten 4,4, 4,6, 4,7, 5,2 und 5,4 konnte wie in III.B.2.5.1. angeben die Enzymaktivität über DC-Auftrennung aus der Inkubation extrahierter Alkaloide detektiert werden. Somit sind Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten zur Oxidation von Tabersonin befähigt.

2.6. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Tabersonin-Dimerisierung durch Catharanthus-Protein

Aus den vorhergehenden Beobachtungen war bekannt, daß die enzymatische Umsetzung von Tabersonin unter Sauerstoffverbrauch abläuft. Die dabei ablaufende Enzymreaktion war nun weiter zu untersuchen.

2.6.1. Hemmstoffe für die Oxidation von Tabersonin

Eine ganze Reihe von Reaktionsmechanismen, prosthetischen Gruppen und Coenzyme kam für die beobachtete Reaktion in Betracht (WALSH, 1981). Durch den Einsatz von Hemmstoffen

sollten diese Möglichkeiten eingegrenzt werden. Dazu wurde Eluat der Farbstoffsäule (III.B.2.5.3.) wie in Tabelle 2 aufgeführt vorbehandelt oder mit Inhibitoren der angegebenen Konzentration versetzt. Zu je 1,7 mg Protein in 0,5 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gab man den jeweiligen Inhibitor und inkubierte damit 10 Minuten bei 30 °C vor. CO wurde aus Ameisensäure und Schwefelsäure erzeugt und 5 Minuten durch die Enzymlösung bei 0 °C geleitet. Ebenso verfuhr man mit N₂ oder Druckluft. Das NADPH-regenerierende System setzte sich wie in III.B.2.1. beschrieben zusammen. Den so vorbereiteten Enzympräparationen wurde Tabersonin·HCl (200 µg; 1 mM) zugesetzt und die Inkubationen bei 30 °C nach 5 Minuten durch Extraktion mit 0,5 ml Essigester abgebrochen. Je 400 µl der organischen Phase ließen sich einengen und wieder in 0,4 ml Methanol aufnehmen. Diese Lösung wurde wie in II.B.3.2. angegeben über HPLC aufgetrennt.

Tabelle 2: Hemmstoffe zur Tabersonin-Oxidation:

Hemmstoff	Tabersonin-Umsatz %	Hemmung	%
ohne	78		0
NADPH 3 mM const.	0		100
Morin 180 µM	68		13
Neocuproin 1 mM	48		38
Phenanthrolin 1 mM	52		33
DTNB 0,5 mM	75		4
Iodacetamid 0,5 mM	68		13
Dicumarol 1 mM	93		-19
Dithiodipyridin 1 mM	57		27
N-Ethylmaleimid 0,5 mM	76		3
p-OH-Mercuribenzoat 0,5 mM	71		9
Pargylin 1 mM	70		10
Diethyldithiocarbamat 1 mM	38		50
KCN 10 mM	8		90
NaN ₃ 40 mM	30		62
Acetylaceton 1 mM	80		0
EDTA 10 mM	78		0
N ₂ 5 min eingeleitet	0		100
CO 5 min eingeleitet	0		100

Die Abnahme von Tabersonin in den einzelnen Ansätzen wurde gegen Inkubationen mit hitzeinaktiviertem Protein und Enzym ohne Inhibitor aufgerechnet. Während ohne Inhibitor 78% der Tabersoninmenge umgesetzt wurde ($\geq 0,75$ nkat/mg Protein), zeigten, wie aus Tabelle 2 ersichtlich, besonders N_2 , NADPH, CO und KCN deutliche Hemmung:

Signifikante Hemmung wurde auch von Neocuproin, Phenanthrolin und Diethyldithiocarbamat, die vornehmlich Kupfer-Enzyme inaktivieren, ausgeübt. Eine bestimmte Enzymklasse konnte der enzymatischen Tabersonin-Oxidation mit diesen Versuchen nicht zugeordnet werden.

2.6.2. Iminium-Tabersonin als Zwischenstufe der Kopplungsreaktion

Die Sauerstoff-abhängige Dehydrierung von Tabersonin mußte zu einem reaktiven Intermediat führen, über das die Verknüpfung zweier Tabersonin-Einheiten zu den Voafrienen und weitere Oxidation zu den Hydroxyvoafrienen vonstatten gehen konnte. In den Umsetzungen mit KCN als Hemmstoff fand sich ein neues Reaktionsprodukt, das über DC im LM B mit R_f von 0,4 zu detektieren war. Aus einem Ansatz mit 100 mg Tabersonin-HCl (250 μ mol) in 3 ml Methanol, 100 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) mit KCN (16 mg; 250 μ mol) und 0,3 g *C.roseus*-Rohprotein konnten nach 12 Stunden unter Sauerstoff bei 30 °C 26 mg (20% Ausbeute) dieser Verbindung isoliert werden. Dabei handelte es sich um ein Cyanid-Addukt des Tabersonin. Ein solches Nitril war bereits von SANTAMARIA et al. (1977) durch photochemische Oxidation in Gegenwart von KCN aus Tabersonin dargestellt worden. Dabei sollte ein intermediär auftretendes Iminium-Tabersonin von der sterisch weniger behinderten Seite her in Stellung 3 vom Cyanid-Ion addiert worden sein (SANTAMARIA et al., 1977). Nachdem die sonstigen Daten des enzymatischen Nitrils (UV, MS, $[\alpha]_D$) mit den Literaturwerten für das photochemisch erhaltene Cyanid übereinstimmten, wurde auch die angegebene Position der Nitril-Gruppe NMR-spektroskopisch verglichen. Dabei waren wiederum, wie bei den Hydroxyvoafrienen erläutert (III.B.2.2.) die chemische Verschiebung sowie die Kopplung des verbleibenden H-3-Signals

ausschlaggebend. Bei 4,82 ppm war diese Resonanzlinie gegenüber den Protonen am C-3 des Tabersonin (3,14 und 3,16 ppm) zu niedrigerem Feld verschoben, bedingt durch den entschirmenden Effekt der Nitrilgruppe. Die großen Aufspaltungen mit H-14 ($J = 4,8$ Hz) und H-15 ($J = 1,5$ Hz) wiesen eindeutig auf das Vorliegen einer H-3 β -Resonanz hin. Dabei ist das H-14 Signal (5,86 ppm; dd, $J_1 = 9,7$ Hz, $J_2 = 4,8$ Hz) kaum gegenüber dem von Tabersonin (5,78 ppm) verschoben. Wegen des Elektronen-Zugs der Nitrilgruppe auf das H-15, als vinylog zur CN-Gruppe benachbartes Proton, erscheint diese Resonanzlinie erst bei 5,95 ppm (dd, $J_1 = 9,7$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz) verglichen mit Tabersonin (5,70 ppm). Abbildung 36 zeigt den wesentlichen Ausschnitt des NMR-Spektrums sowie die Lage der 3 α -Nitrilgruppe.

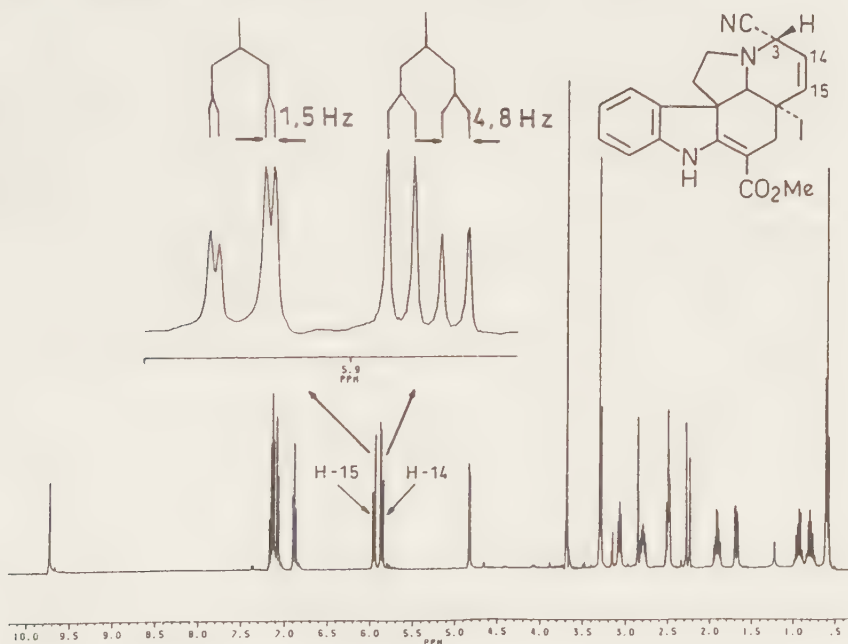
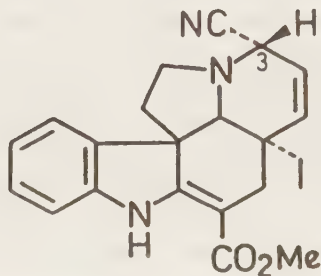


Abb. 36: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von 3 α -Cyano-Tabersonin. Die 4,8 Hz Kopplung von H-3 mit H-14 beweist die β -Stellung von H-3 und damit die α -Stellung der Nitril-Gruppe

Somit stimmten auch die NMR-Daten des Reaktionsprodukts der enzymatischen Umsetzung mit denen des photochemisch dargestellten 3 α -Cyanotabersonin überein.

3 α -Cyano-Tabersonin.



Es lag daher die Vermutung nahe, daß das primäre Produkt der Enzymreaktion ebenfalls das Iminium-Ion des Tabersonin war. Der indirekte Nachweis eines solchen reaktiven, instabilen Produkts durch Abfangen als Nitril ist für Iminiumformen von Alkaloiden recht geläufig (BROWN und LEONARD, 1977; KAN-FAN und HUSSON, 1978; SARIASLANI et al., 1984). Auch die Addition der Hydroxy-Voafrine an Thioglycerol im FAB-Massenspektrum (III.B.2.2.) war durch eine Iminium-Form erklärbar, wie sie auch NMR-spektroskopisch nach Eliminierung von H₂O nachweisbar war (III.B.2.2.). Als weiteres solches Reaktionsprodukt mit Iminium-Tabersonin war auch das Addukt mit Dithioerythrit im Enzymansatz aufgefallen.

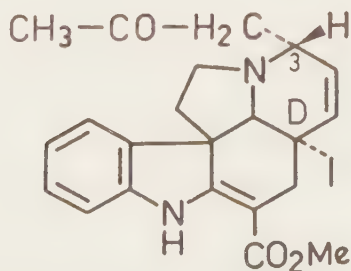
Weitere Evidenz für das Vorliegen von Iminium-Formen war aus den Additionsprodukten zu erhalten, die aus Ansätzen mit Aceton als Lösungsmittel für das Alkaloid gewonnen wurden. Dazu gab man 130 mg Tabersonin·HCl in 2,5 ml Aceton gelöst zu 100 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,5) mit 0,3 g Rohprotein; bei 30 °C wurde der Ansatz unter Sauerstoff-Atmosphäre 12 Stunden im Wasserbad umgerührt. Nach Extraktion mit Dichlormethan konnten im LM B dünnschichtchromatographisch ein Hauptprodukt (4 mg; R_f 0,4 mg) und zwei Nebenprodukte (R_f 0,2 und 0,1) mit je ca. 1 mg isoliert werden.

Zunächst wurde dieses Hauptprodukt untersucht. Mit einem Molekularpeak von 392 m/z und dem Signal 335 m/z ($M^+ - 57$) im Massenspektrum lag die Addition einer Acetonyleinheit zwingend nahe. Aus der weiteren Fraktionierung war dabei eine Substitution an Ring D ersichtlich. Reduktion der Verbindung mit NaBH_4 (II.B.1.2.) resultierte in zwei Produkten, bei denen Zunahme des Molekulargewichts um zwei Masseneinheiten festzustellen war. Dies entsprach zwei Diastereomeren aus der Reduktion der Aceton-Carbonylgruppe, wobei die Allylamin-Doppelbindung in Ring D nicht abgesättigt werden konnte. Weiteren Aufschluß über die Struktur des Acetonyl-Addukts vor Reduktion gab das Kernresonanz-Spektrum. Als gegenüber dem Tabersonin neu auftretende Signale wurden Resonanzen für die Protonen der Methylgruppe (2,22 ppm) und der Methylengruppe (2,66 und 2,85 ppm) der Acetonyleinheit registriert.

Die vicinalen Kopplungen des H-3 Protons mit beiden $\text{CH}_2\text{-CO-Me}$ Protonen und mit H-14 ($J = 4,5 \text{ Hz}$) beweisen das Vorliegen von 3 α -Acetonyltabersonin. Abbildung 37 zeigt dazu ein Doppelresonanz-Experiment, bei dem diese Kopplungen mit H-3 β aufgehoben werden.

Ein weiteres Additionsprodukt als indirekter Nachweis des Iminium-Tabersonins, mit dem als Nucleophil agierenden Aceton, war damit charakterisiert worden.

3 α -Acetonyl-Tabersonin.



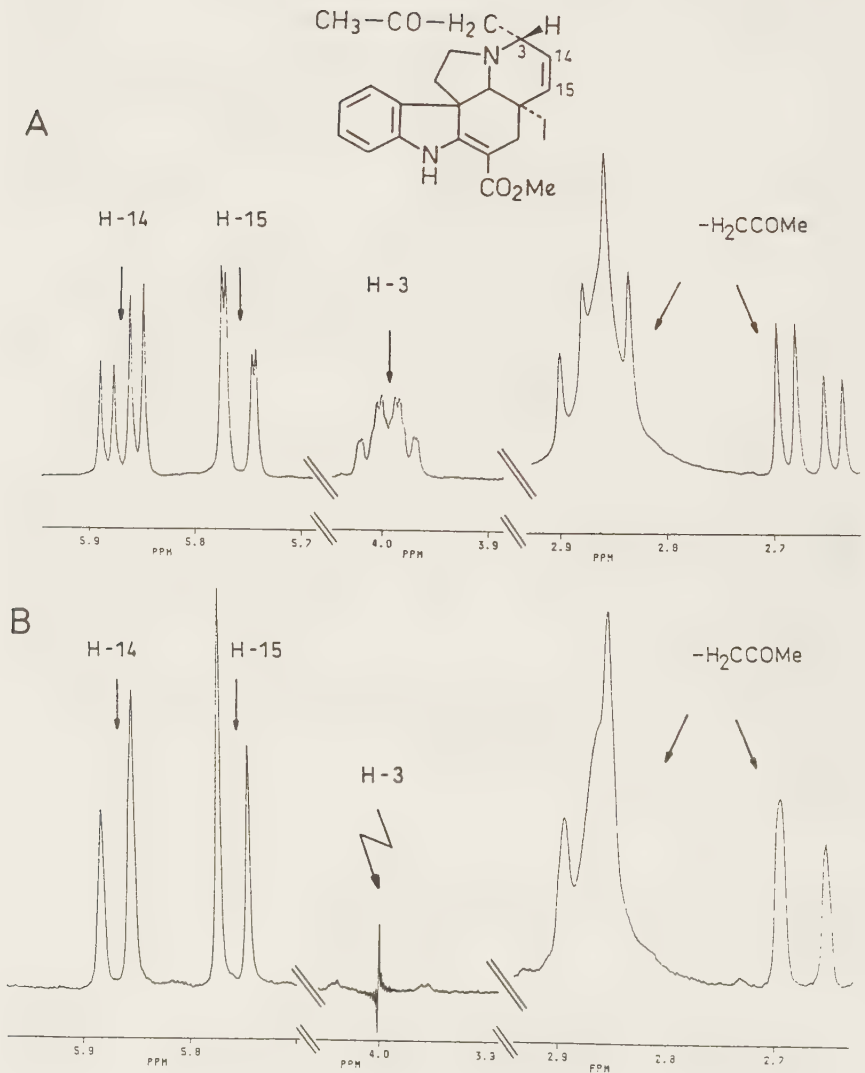
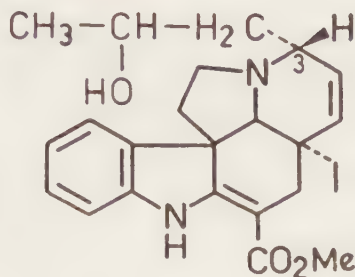


Abb. 37: Doppelresonanz-Experiment mit Acetonil-Tabersonin;
 Einstrahlen von H-3 hebt die zugehörigen Kopplungen auf

3 α -(2-Hydroxy-propyl)-Tabersonin



Die beiden weiteren Reaktionsprodukte des Enzymaninsatzes mit Aceton (R_f 0,2 und 0,1 im LM B) wiesen mit ihren Massenspektren (größte Fragmente bei 683 m/z oder 726 m/z) ebenfalls auf Acetonyl-Additionsprodukte, hier der Voafrine hin. Reduktion der polareren Verbindung führte zu einem Produkt, dessen MS-Molekülpeak bei 728 m/z registriert werden konnte. Dies entsprach wiederum einem 2-Propanol-Addukt dieses Voafrins. Über $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurde die Struktur des zugrunde liegenden Acetonyl-Voafrin B abgeklärt. Die Kopplungen von H-3' (br d, $J = 4,8$ Hz), H-14' und H-15' untereinander bewiesen die Voafrin B-typische Verknüpfung mit β -ständigem H-3' (III.B.2.2.); Lage und Kopplungen des H-3 β Signals (4,70 ppm; dd, $J_1 = 10,9$ Hz, $J_2 = 3,9$ Hz) sicherten die α -Stellung der Acetonyleinheit ab. Vor allem eine Verbreiterung des Signals von H-21 durch Fernkopplung mit H-3 β , die mit H-3 α nicht auftritt, bewies die Orientierung des verbliebenen Protons am C-3 (Abb. 38).

3 α -Acetonyl-Voafrin A.

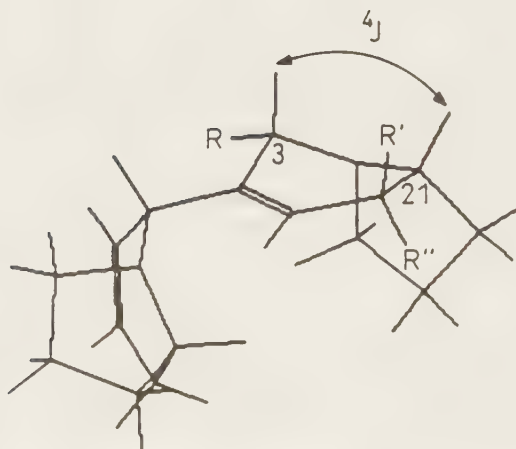
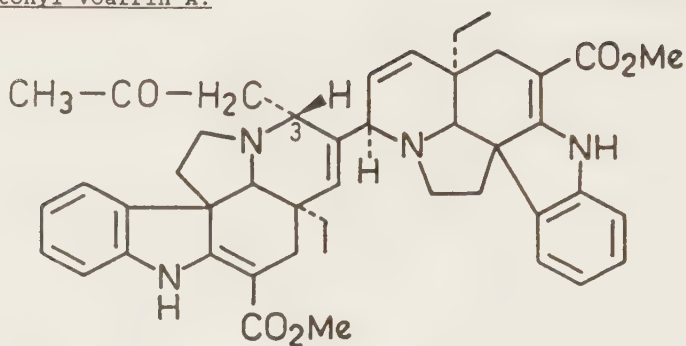
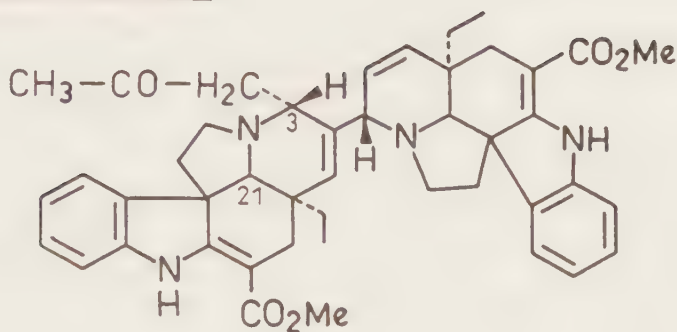


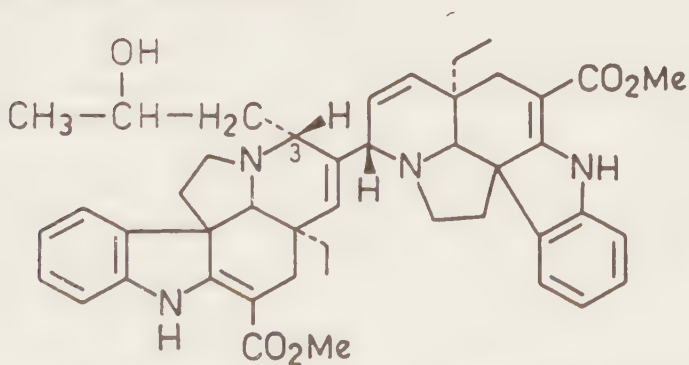
Abb. 38: Fernkopplung zwischen H-3 β und H-21; R = Acetyl

Die so identifizierten Acetylvoafrine waren als Additionsprodukte von Voafrin oder Acetyltabersonin interpretierbar, wiederum über entsprechende Iminium-Intermediate.

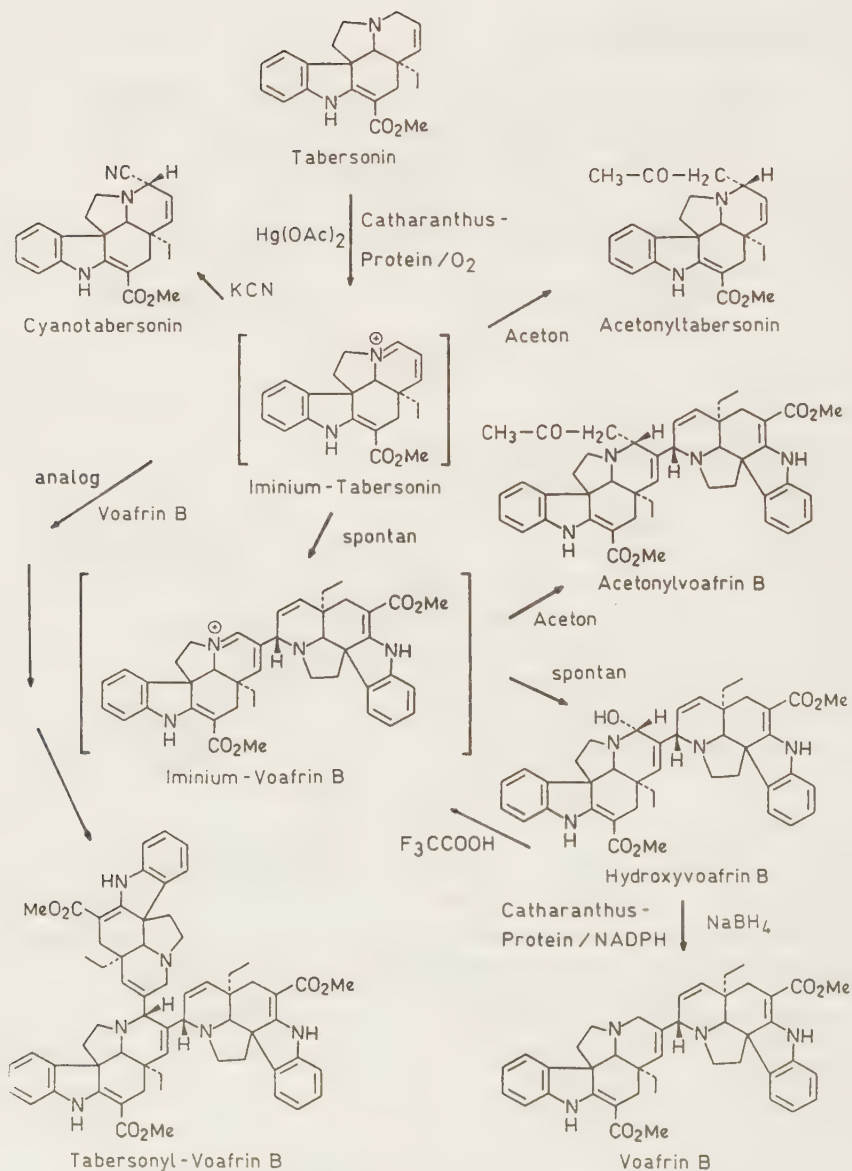
3 α -Acetonyl-Voafrin B.



3 α -(2-Hydroxy-propyl)-Voafrin B.



Das Auftreten dieser gesamten Verbindungen darf als gesicherter indirekter Nachweis von Iminium-Intermediaten gelten, wie es nachfolgend in Schema 10 am Beispiel der Produktreihe mit H-3 β -Konfiguration dargestellt wird.



Schema 10: Iminium-Tabersonin und Iminium-Voaftrin als Intermediate der Kopplungsreaktionen. (Die chemische Methode zur Erzeugung von Iminium-Tabersonin wird weiter unten erläutert)

2.7. Definierte Systeme für die Bildung von Iminium-Tabersonin

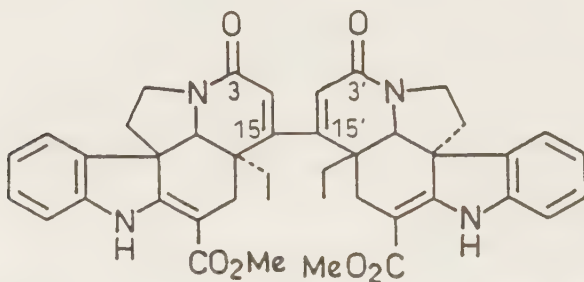
Für Tabersonin war, wie schon oben erwähnt, die photochemische Umsetzung zum Iminium-Tabersonin und dessen Abfangen als Nitril beschrieben (SANTAMARIA *et al.*, 1977). Diese rein chemische Methode lieferte in diesem Fall das identische Reaktionsprodukt wie die in Anwesenheit von KCN durchgeführte enzymatische Umsetzung mit *C. roseus* Protein. Durch diesen Befund drängte sich die Fragestellung auf, ob schon die Erzeugung von Iminium-Tabersonin spontan zur 3,14' Verknüpfung der Voafrine führen könnte. Neben der Photooxidation von Tabersonin war für das strukturell nahe verwandte Vindolin von der Arbeitsgruppe um ROSAZZA eine umfangreiche Untersuchung zu den Reaktionsprodukten einer Iminium-Zwischenstufe durchgeführt worden. Diese Oxidation von Vindolin konnte mit verschiedenen Methoden erreicht werden (NABIH *et al.*, 1978; GUSTAFSON und ROSAZZA, 1979; ECKENRODE *et al.*, 1982; SARIASLANI *et al.*, 1984; SARIASLANI *et al.*, 1985). Weiterhin boten sich gebräuchliche chemische Reaktionen zur Erzeugung von Iminium-Ionen wie Oxidation mit Quecksilber-II-acetat (LEONARD und HAUCK, 1957) oder Eliminierung einer α -Nitrilgruppe mit Silber-Salzen (REIBER und STEWART, 1940) zur Erprobung an.

2.7.1. Photochemische Oxidation von Tabersonin

Der von SANTAMARIA *et al.* (1977) beschriebene Reaktionsansatz wurde in Abwesenheit des als Iminium-Fänger zugesetzten KCN wiederholt. Dazu löste man 120 mg Tabersonin-HCl (0,32 mmol) in 12 ml Methanol und gab dazu eine Lösung von 100 mg Bengalrosa (0,1 mmol) in 3 ml 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0. Die klare, rote Lösung wurde in einen unten abgeschlossenen Kugelkühler eingefüllt und mit Stickstoff durchströmt. Durch den Wasser-Kühlmantel hindurch belichtete eine Philips PF 318 Argaphot BM Lampe (500 W) den Ansatz in einem Abstand von 10 cm 4 Stunden lang. Anschließend wurde das Gemisch auf 2 ml eingeeengt und mit Dichlormethan extrahiert. Auftrennung dieser Reaktionsprodukte auf Kieselgel-Dickschicht-Platten im LM C ergab mehrere Reaktionsprodukte.

Das polarste Produkt (R_f 0,2) ließ sich als 3-Oxotabersonin (III.B.2.4.2) identifizieren. Bei R_f 0,6 fand sich ein Produkt, das im Massenspektrum ein schwerstes Ion mit 698 m/z zeigte, was auch durch die weiteren Signale das Vorliegen eines Dioxo-Tabersonin-Dimeren nahelegte. Das in DMSO aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum dieses Dimeren war unübersichtlich. In Analogie zu den Verhältnissen beim Hydroxyvoafrin B (III.B.2.2.) besserte sich dies auf Zugabe von 5% v/v D_2O . Nun konnten das Fehlen von H-3,3' Signalen und für H-14,14',15,15' ein einziges Singulett bei 5,78 ppm registriert werden. Im Einklang mit den Daten für 3-Oxovoafirin A und 3-Oxotabersonin (III.B.2.4.2) läßt sich daraus eine 15,15' Verknüpfung der Tabersonyleinheiten ableiten.

3,3'-Dioxo-15,15'-Ditabersonin

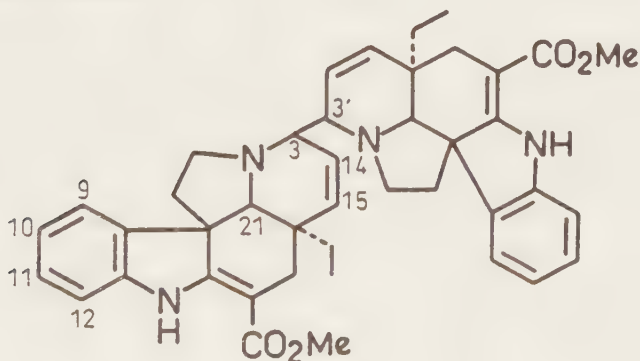


Bei R_f 0,5 und 0,7 wurden zwei Tabersonindimere mit jeweils einer Oxo-Gruppierung aufgefunden. Aufgrund der deutlichen Abweichungen vom Massenspektrum von 3-Oxovoafirin A (III.B.2.4.) konnte es sich dabei auch nicht um Voafrin-Derivate mit 3',14 Verknüpfung handeln.

Das am wenigsten polare Produkt (R_f 0,8) besaß entsprechend der massenspektroskopischen Analyse zwar ebenfalls ein Molekulargewicht von 670, zeigte jedoch große Unterschiede zur sonstigen Fragmentierung der Voafrine. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ähnelten in hohem Maße Vergleichsmessungen mit

Tabersonin; das Vorliegen eines Tabersonin-Dimeren war aus ihnen nicht abzuleiten. Dies forderte ein hohes Maß an Symmetrie für dieses Molekül. Deutliche Unterschiede zum Tabersonin-Spektrum zeigte im ^{13}C -NMR nur das Signal für C-3. In einer Messung, in der nur Resonanzen von Methin-Gruppen erfaßt wurden (DEPT-Experiment; II.B.6.2.), erwies sich neben C-9,10,11,12,14,15 und C-21 hier auch C-3 als tertiäres Kohlenstoff-Atom. Außerdem lag dieses Signal bei 60,65 ppm im Gegensatz zu dem des C-3 von Tabersonin (sekundäres C-Atom) bei 49,81 ppm. Im Protonen-Spektrum wichen die Signale für H-14,14' und H-15,15' vom Tabersonin-Spektrum ab. Die Aufspaltung dieser Resonanzlinien in einem AB-System mit der Kopplung 10,3 Hz läßt sich ebenfalls auf eine 3,3'-Verknüpfung dieses Ditabersonins zurückführen. Die Resonanzen für die verbleibenden H-3 waren von Wasser-Verunreinigungen verdeckt.

3,3'-Ditabersonin

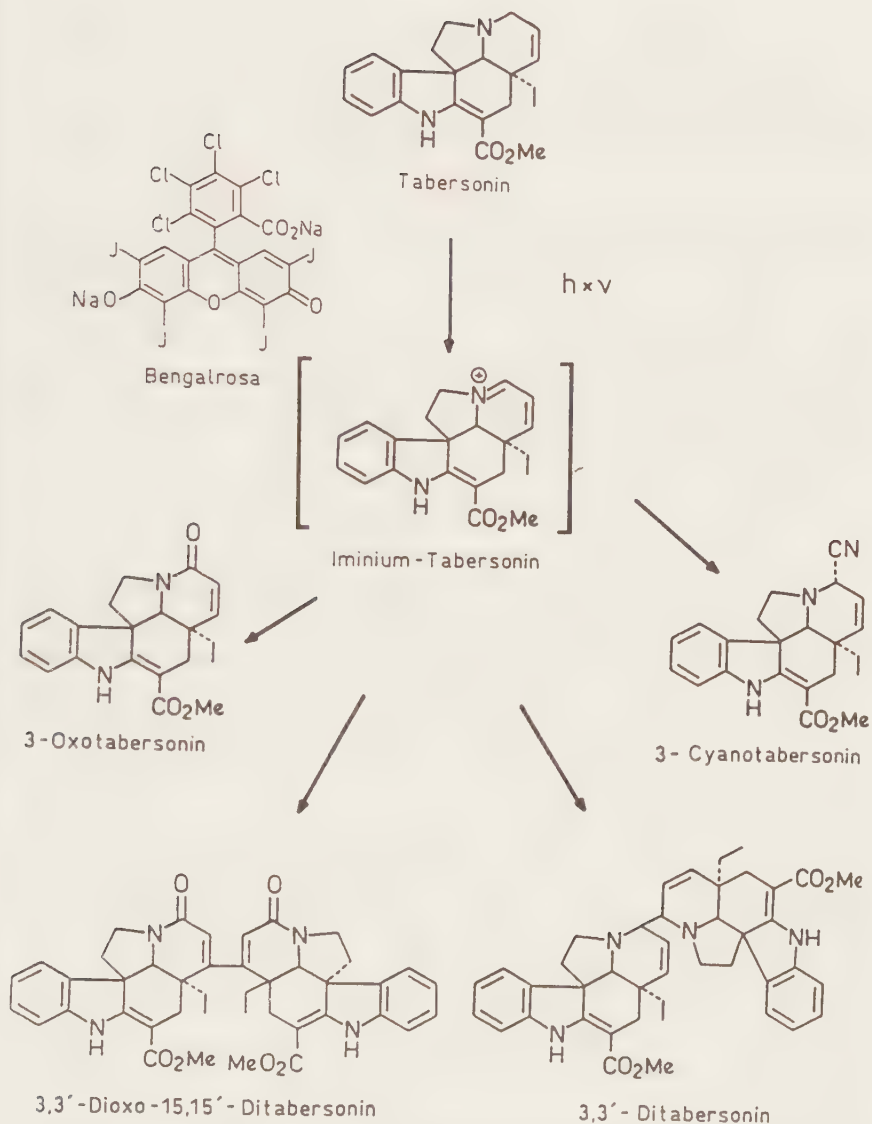


Während 15,15'-Ditabersonin, 3-Oxotabersonin und Oxo-Ditabersonine reproduzierbar als Reaktionsprodukte in ca. 5% Ausbeute gewonnen werden konnten, war das 3,3'-Ditabersonin nur in stark schwankenden Mengen (0-10% Ausbeute) zu erhalten. Das Auftreten der Oxo-Verbindungen ließ sich durch intensivere Entfernung von Sauerstoff aus dem Photooxidations-Gemisch (Entgasen der Lösung, stärkerer N_2 -Strom) deutlich vermindern.

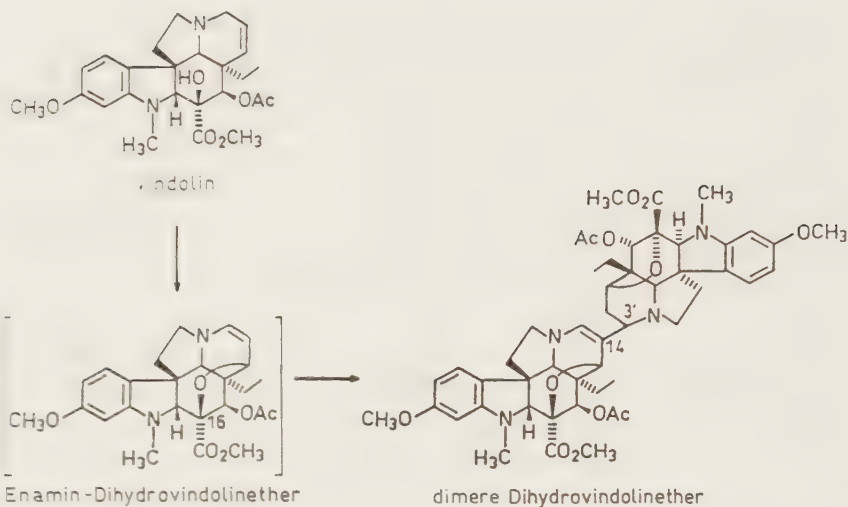
Aus dieser photochemischen Reaktion ließen sich als Hauptprodukte keine Dimere mit der für die Voafrine typischen 14,3'-Verknüpfung erhalten; auch aus einem Ansatz nur in Phosphat-Puffer, analog zu den Verhältnissen bei der enzymatischen Reaktion, waren keine Voafrine zu identifizieren. Da jedoch jeweils ca. 5 weitere Nebenprodukte mit CAS-Reagenz gerade noch detektierbar waren, deren Struktur mangels Substanz jedoch nicht aufgeklärt werden konnte, kann die Bildung von Voafrinen oder deren 3-Oxoderivaten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Aufgrund der geringen Ausbeuten an Reaktionsprodukten unter fast vollständigem Verlust des eingesetzten Tabersonins kam auch eine präparative Darstellung der neuen Tabersonin-Dimere in dieser improvisierten Apparatur nicht in Betracht. Schema 11 stellt nochmals diese Reaktionen vor.

2.7.2. Die Reaktivität von Tabersonin in Systemen zur Darstellung von Iminium-Vindolin

Von NABIH *et al.* (1978) war die Dimerisierung von Vindolin durch *Streptomyces griseus* beschrieben. Im weiteren konnte für diese Reaktion gezeigt werden, daß verschiedene enzymatische und chemische Modellsysteme über die Zwischenstufe eines reaktiven Iminium-Vindolin zu diesem Produkt führen (SARIASLANI *et al.*, 1984). Dabei entsteht zunächst durch Beteiligung der 16-Hydroxygruppe des Vindolin ein intramolekularer Ether, der spontan zu dem Enamin-Dimeren weiterreagiert (GUSTAFSON und ROSAZZA, 1979). In Schema 12a ist diese Reaktionsfolge illustriert.



Schema 11: Photochemische Oxidationsprodukte von Tabersonin



Schema 12a: Dimerisierung von Vindolin (GUSTAFSON und ROSAZZA)

Da sich die strukturellen Unterschiede dieses Dimeren zu den Voacifinen durch die bei Tabersonin fehlende Hydroxylgruppe in Stellung 16 erklären, die Verknüpfung aber gleichermaßen über C-14 und C-3' stattfindet, waren diese umfangreich charakterisierten Modelle für einen Vergleich mit der Tabersonin-Umsetzung bestens geeignet.

Ein Versuch zur mikrobiellen Alkaloid-Oxidation wurde mit 10 aus der Erde von *Catharanthus roseus* Topfpflanzen auf Sabouraud-Glucose Agar (Merck) angezogenen Mikroorganismen durchgeführt, da die Topferde durch Blattfall ständig mit *Catharanthus*-Alkaloiden kontaminiert ist. Diese Organismen waren morphologisch unterscheidbar, wurden aber nicht weiter charakterisiert. Submerskulturen wurde in einer zweiten Kulturstufe während der logarithmischen Wachstumsphase Tabersonin-HCl in 135 µM Konzentration zur Umsetzung angeboten. Das dazu verwendete Flüssigmedium bestand aus Sojamehl (5,0 g), Glucose (20,0 g), NaCl (5,0 g) und K₂HPO₄ (5,0 g) auf 1 l Aqua dest. und war auf pH 7,0 eingestellt. Die Kulturen wurden in 100 ml Kolben (20 ml Medium, 1 mg

Tabersonin·HCl) mit 100 rpm bei 28 °C geschüttelt. Einer dieser Organismen setzte Tabersonin in 10 Tagen zu 70% um. Zwei Metaboliten, die im Verhältnis 1:1 gebildet worden waren, zeigten gleiches DC-Laufverhalten und gleiche Massenspektren wie Voafirin A und Voafirin B.

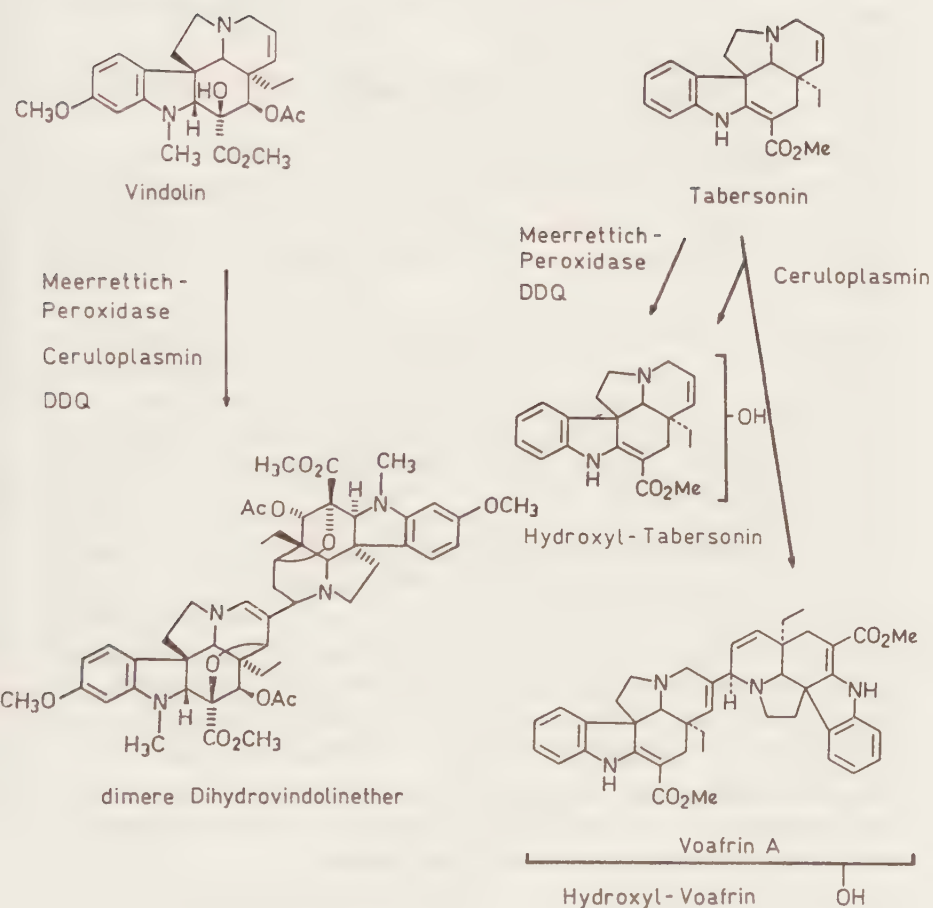
Für den direkten Vergleich mit Vindolin wurden die definierten *in vitro*-Systeme herangezogen. Enzymatische Oxidation mit Meerrettich-Peroxidase (SARIASLANI *et al.*, 1985) und Kupferoxidasen (ECKENRODE *et al.*, 1981) sowie das chemische Oxidase-Modell mit 2,3-Dicyano-4,5-dichlorbenzochinon (DDQ) (SARIASLANI *et al.*, 1984) hatten gleichermaßen eine Dimerisierung von Vindolin ergeben. Solche Ansätze mit Vindolin wurden nun parallel durchgeführten Reaktionen mit Tabersonin gegenübergestellt.

Zur Umsetzung mit Peroxidase gab man 10 mg Vindolin bzw. Tabersonin·HCl, in je 0,25 ml Methanol gelöst, zu 25 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8 mit 12,5 µkat Meerrettichperoxidase EC 1.11.1.7 (Aktivität auf Pyrogallol als Substrat bezogen). Mit je 2 ml einer 1,7 mM H₂O₂-Lösung wurde die Reaktion gestartet und 12 Stunden bei 25 °C unter Umrühren fortgeführt. Nach Alkalisieren der Ansätze mit Ammoniaklösung (pH 9) folgte die Extraktion des Reaktionsgemisches mit Ethylacetat. Die beiden Umsetzungen wurden durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der organischen Phasen analysiert. Die Umsetzungsrate ließ sich durch photometrische Bestimmung von eluiertem Vindolin ($\epsilon_{304}=3,71$) und Tabersonin ($\epsilon_{328}=4,17$) abschätzen. Unter diesen Bedingungen war Vindolin zu 30% wiedergefunden worden. Im LM A war über dem Ausgangsprodukt (R_f 0,35) eine neue Verbindung (R_f 0,5) erkennbar, deren MS-Daten mit denen des von NABIH *et al.* (1978) beschriebenen Vindolin-Dimeren übereinstimmten. Dieses Dimere war auch als weniger polar als Vindolin angegeben worden. Unter der Vindolinzone war allerdings ein polareres Kopplungsprodukt (M^+ 908 m/z) mit einem R_f -Wert von 0,2 aufzufinden. Tabersonin konnte zu 35% weniger als eingesetzt bestimmt werden. Im LM C ließ sich unter Tabersonin (R_f 0,7)

als Hauptprodukt (R_f 0,1) eine Verbindung mit Molekulargewicht 352 (Tabersonin + 16 m/z) erhalten.

Als nächstes wurde eine Oxidation mit DDQ getestet. Je 10 mg Alkaloid (22 μ mol Vindolin; 27 μ mol Tabersonin) in 5 ml Methanol wurde mit 6 mg DDQ (27 μ mol) versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend gab man je 5 ml 2 N Schwefelsäure zu den Ansätzen, engte sie auf je 4 ml ein und extrahierte diese wässrige Lösung mit Dichlormethan. Die Wasserphase wurde mit Na_2CO_3 auf pH 8 eingestellt und wiederum, mit Ethylacetat, ausgeschüttelt. Der Rückstand der Essigesterphase ließ sich für Vindolin und Tabersonin getrennt wie oben angegeben chromatographieren. Vindolin war bei dieser Reaktion zu 85% umgesetzt, als Produkt ausschließlich das Literatur-bekannte weniger polare Dimere zu identifizieren. Aus Tabersonin, das zu 70% abreagiert hatte, war wiederum die oxidierte Verbindung mit R_f 0,1 als Produkt aufzufinden.

Das dritte Modellsystem bestand aus Ceruloplasmin, einer Kupferoxidase, der als Pseudosubstrat Chlorpromazin zugegeben wurde. Je 10 mg Alkaloid in 0,25 ml Methanol wurden in 60 ml 0,2 M Natriumacetat-Puffer pH 5,5 mit 18 mg Chlorpromazin und 3,4 μ kat Ceruloplasmin (bezogen auf Oxidation von N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin) 12 Stunden bei 37 °C umgerührt. Nach Alkalisieren mit Ammoniak (pH 9) extrahierte man die Ansätze mit Ethylacetat. Die weitere Aufarbeitung und Auswertung erfolgte wie bei der Umsetzung mit Peroxidase. Vindolin hatte vollständig reagiert. Die beiden von dem Peroxidase-Ansatz her bekannten Vindolindimeren mit Molekülionen bei 908 m/z waren auch hier nachzuweisen. Tabersonin hatte sich zu 65% umsetzen lassen. Zwei Produkte mit R_f 0,6 traten mit Molekulargewicht 352 und 670 (von Laufverhalten und MS-Daten her Voafrin A) auf. Ein polareres Produkt (R_f 0,2) mit größtem Signal bei 686 m/z im Massenspektrum war durch die sonstige Fragmentierung als ein hydroxyliertes Voafrin ausgewiesen. Schema 12b zeigt die erzielten Umsetzungen in diesen modellhaften Systemen.



Schema 12b: Vergleich der Umsetzungen von Vindolin und Tabersonin

Nur bei der Oxidation mit Ceruloplasmin hatte bei den *in vitro* Ansätzen mit Tabersonin eine 14,3' Verknüpfung von Tabersonyl-Einheiten stattgefunden.

2.7.3. Darstellung von Iminium-Tabersonin mit chemischen Methoden

Zwei gängige Möglichkeiten, chemisch Iminium-Salze von Alkaloiden herzustellen, waren Oxidation mit Quecksilber-II-acetat (KUTNEY *et al.*, 1970) und Eliminierung einer Nitrilgruppe α -ständig zum Stickstoff (BROWN und LEONARD, 1977).

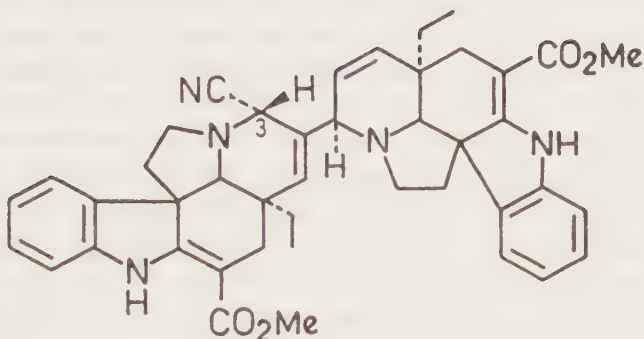
3 α -Cyano-Tabersonin war aus enzymatischer Herstellung vorhanden (III.B.2.6.3.). 5 mg Nitril, gelöst in 2 ml Ethanol, wurden mit 5 mg Ag₂CO₃ bei Raumtemperatur einen Tag lang gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels konnten im LM C aus dem vollständig umgesetzten Nitril 2 Produkte mit R_f 0,4 und 0,3 gewonnen werden.

Das Massenspektrum mit schwersten Ionen von je 695 m/z wies diese Verbindungen als Cyano-Derivate der Voafrine aus. Näher untersucht wurde das Produkt mit R_f 0,4. Im ¹H-NMR-Spektrum war eine Voafrin A -typische Verknüpfung zu erkennen. Die Signale von H-15' und H-14' zeigten nur kleine Kopplungen mit H-3' α . Das Signal für H-3 war mit 4,74 ppm ähnlich verschoben wie das H-3 im 3 α -Cyano-Tabersonin (4,82 ppm).

Eine Retention der α -Stellung der Nitril-Gruppe, wie aus dem Cyano-Tabersonin, war damit mehr als wahrscheinlich und dieser Substanz die Struktur eines 3 α -Cyano-Voafrin A zugeordnet.

Auch hier war eine Voafrin -typische 14,3'-Verknüpfung spontan entstanden. Die Oxidation mit Hg(OAc)₂ brachte endgültige Gewißheit, daß die im Enzymansatz aufgefundenen Produkte spontan aus Iminium-Tabersonin entstanden waren.

3 α -Cyano-Voafrin A.



In 1 ml 100% Essigsäure wurden 70 mg $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (220 μmol) gelöst und 10 min Stickstoff durch diese Lösung geleitet. Anschließend gab man 26 mg Tabersonin $\cdot\text{HCl}$ (70 μmol) zu und rührte weitere 40 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoff-Atmosphäre um. Entstandenes Quecksilber-I-acetat wurde abzentrifugiert. Der Eisessig ließ sich im Stickstoffstrom auf 50 μl einengen und der Rückstand in 1 ml Methanol aufnehmen. Reduktion mit NaBH_4 (II.B.1.2.) führte quantitativ zum Ausgangsprodukt; ohne Reduktion verblieb die Hauptmenge des mit CAS-Reagenz blau zu detektierenden Alkaloids im LM C am Start; daneben war nur nicht oxidiertes Tabersonin zu erkennen. Ein solcher Ansatz wurde, nach Abziehen der Essigsäure, ohne Reduktion in 0,2 ml Methanol aufgenommen und in 5 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gegeben. Unter denselben Bedingungen wie bei der enzymatischen Reaktion wurde nach 24 Stunden diese Mischung mit Dichlormethan extrahiert. Nach DC im LM C wurden als Produkte die Hydroxyvoafrine A (0,65 mg, 3%) und B (0,5 mg, 2%) über Cochromatographie und Massenspektroskopie identifiziert. Reduziert mit NaBH_4 ergaben diese Verbindungen die entsprechenden Voafrine. Da auch nur 0,75 mg Tabersonin, ebenfalls photometrisch bestimmt, zurückgewonnen werden konnten, und die Hauptmenge an Alkaloid an der Startzone verblieben war, wurde in einem Parallel-Ansatz der Rückstand der Dichlormethan-Phase vor der

chromatographischen Auftrennung reduziert (II.B.1.2.). Hier konnten 2,5 mg Tabersonin (10% des Einsatzes), 1,5 mg Voafrin A (6,3%), 1,35 mg Voafrin B (5,7%) und 7,4 mg Tabersonyl-Voafrin B (32%) über MS identifiziert und photometrisch bestimmt werden. Danach war die Hauptmenge auch der schon gekoppelten Tabersoninderivate in der Iminiumform vorgelegen.

Um das Iminium-Ion als Zwischenstufe bei der chemischen Oxidation nicht nur durch Reduktion nachzuweisen, wurde ein Oxidationsansatz w.o. nach Abziehen der Essigsäure in Methanol aufgenommen und zu 5 ml Phosphat-Puffer mit 10 mg KCN gegeben. Nach Extraktion und DC-Aufarbeitung im LM C konnten aus dem vollständig abreagiertem Iminium-Tabersonin 3 Nitrile erhalten werden.

Die Massenspektren der beiden polareren Produkte mit R_f 0,3 und 0,4 zeigten gleiche Molekül-größen und Fragmentierungen wie die Cyano-Voafrine, die durch Umsetzung von Cyano-Tabersonin mit Ag_2CO_3 erhalten wurden. Das Produkt mit R_f 0,5 ließ sich durch Cochromatographie, Massenspektroskopie und NMR-Daten als 3α -Cyanotabersonin identifizieren.

2.8 Tabersonin-Umsetzungen mit Vesikel- und Mikrosomenfraktionen aus *C. roseus* Blättern.

Mit löslichen Proteinfractionen aus *C. roseus* Blättern konnte außer der oben beschriebenen Oxidation von Tabersonin keine weitere Umsetzung, etwa zum 11-Hydroxy-Derivat, beobachtet werden. So wurden auch Präparationen von Membranproteinen und subzellulären Strukturen auf ihre Fähigkeit, Tabersonin umzusetzen, geprüft.

2.8.1. Partikelassozierte Proteine aus *C. roseus*

Nach der Methode von DIESPERGER et al. (1974) wurden 50 g Blätter frisch mit 50 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) im Sorvall-Mixer unter Eiskühlung vermahlen und durch Windelstoff abfiltriert. Das Filtrat verblieb 20 Minuten in der Zentrifuge bei 12.000 g. Zu dem Überstand gab man $MgCl_2$ in 30 mM Endkonzentration und zentrifugierte nochmals unter denselben Bedingungen. Dieser Mikrosomen-Niederschlag wurde im Aufschlußpuffer suspendiert und über Sephadex G 25 gel-

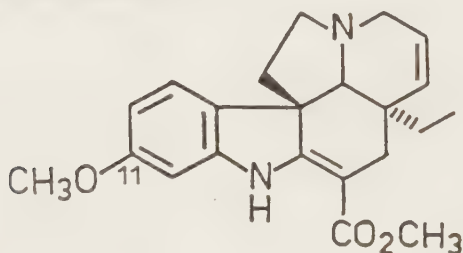
filtriert. Inkubationen à 1 ml Enzymlösung ($\approx 0,5$ mg Protein) enthielten neben 200 μg Tabersonin-HCl ($0,5 \mu\text{M}$) je 10-100 μM Eisen-II-sulfat; 10 μM Eisen-II-sulfat und 5 mM Ascorbat; 0,1-1 mM α -Ketoglutarat; 0,1 μM Kupfer-II-sulfat; 30 nkat Katalase; 1,2 mM NADPH, 16 mM Glucose-6-phosphat und 30 nkat Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; 0,5 mM Dimethylpterin, 30 nkat Dihydropteridin-Reduktase und NADPH-regenerierendes System wie vor; 1 mM FADH_2 ; 10 mM Glucose und 30 nkat Glucoseoxidase und schließlich frischen, ultrafiltrierten Hefeextrakt. Nach 2 Stunden bei 30°C wurden die Ansätze mit Essigester extrahiert und in LM A die organische Phase dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Als Produkte konnten nur Voafrin A und B aufgefunden werden. Ebenso verhielten sich Inkubationen mit löslichem Protein unter diesen Bedingungen. Auch Variieren der Aufschlußmethodik für die membrangebundenen Proteine wie Verreiben der Blätter im Mörser mit Seesand und Polyvinylpolypyrrolidon, belichten der Enzymlösung vor Inkubation, Aktivierung mit 5 mM Eisen-II-sulfat und 50 mM Ascorbat unmittelbar vor der Gelfiltration, und Solubilisierung mit 1% w/v Triton X-100 erbrachten keine anderen Ergebnisse. Auffällig war jedoch die Bildung der Voafrine durch partikelassoziiertes Protein in Anwesenheit von NADPH.

2.8.2. Aufschluß unter Erhalt subzellulärer Strukturen aus *C. roseus* Blättern

Für eine oxidative Hydroxylierung konnte intakte Kompartimentierung beteiligter Enzyme unter aufrecht erhaltenen Membranpotentialen wesentlich sein. So wurde auch eine Aufschlußmethode angewendet, die subzelluläre Vesikel und Organellen intakt erhalten sollte. In Anlehnung an die Vorschrift von BREIDENBACH und BEEVERS (1967) wurden 100 g Blätter von *C. roseus* mit Seesand und 100 ml Tricin-Na Puffer (75 mM, pH 7,5) mit 0,25 M Saccharose, 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2 und 1 mM EDTA im eisgekühlten Mörser verrieben. Durch Windelstoff erhaltenes Filtrat unterwarf man zunächst einer Zentrifugation bei 3.000 g (20 Minuten). Anschließend zentrifugierte man den Überstand für 40 Minuten bei 40.000 g.

Dieser Niederschlag ließ sich in Aufschlußpuffer aufnehmen und über Sephadex G 25 gelfiltrieren. Die so erhaltene Präparation wurde mit Inkubationen wie in III.B.8.1. aufgelistet getestet. Wiederum konnten als Produkte Voafrin A und B identifiziert werden. Darüber hinaus fiel im LM B bei R_f 0,4 auf den Chromatogrammen eine blau fluoreszierende Zone auf, die allerdings auch aus Kontrollinkubationen ohne zugesetztes Tabersonin zu extrahieren war. Weitere Reinigung im LM A (R_f 0,6) erbrachte ein Alkaloid, das massenspektroskopisch als 11-Methoxy-Tabersonin zu identifizieren war.

11-Methoxy-Tabersonin



Vindolin, (Epi)-Vindolinin, Catharanthin und andere Hauptalkaloide der Blätter waren nicht aus dieser Präparation nachzuweisen; vielmehr wurde ein spezifisch kompartimentiertes Spurenalkaloid, das ein Intermediat der Vindolin-Biosynthese ist (QURESHI und SCOTT, 1968; DELUCA et al., 1986), durch die Aufschlußmethodik hoch angereichert.

Inkubationen dieser Präparationen mit Tabersonin, Hefeextrakt und ^3H -SAM (50 nmol, 37 kBq) erbrachten kein markiertes 11-Methoxytabersonin.

3. Darstellung von putativen Biosyntheseintermediaten des Vindolin

In den vorangegangenen Untersuchungen war es nicht gelungen, durch Isolierung von Alkaloiden aus *C. roseus* Fruchtwänden und Blättern Intermediate zu erhalten, die zur Suche nach an der Vindolin-Biosynthese beteiligten Enzymen geeignet waren. Lediglich Methoxytabersonin, in Spuren aufgefunden, konnte zumindest identifiziert werden. Dagegen war Vindolin, Endprodukt des untersuchten Biosynthesewegs, als Hauptalkaloid von *C. roseus* leicht verfügbar. Durch Abbau sollten nun aus Vindolin solche Derivate zugänglich werden, die sich durch Catharanthus-Enzyme wieder zum Ausgangsprodukt dieser Umwandlungen aufbauen lassen sollten.

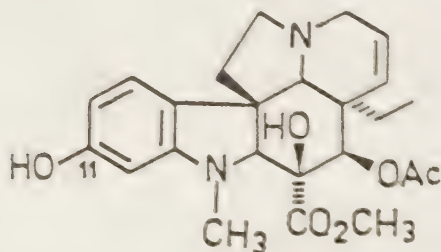
Außer der Abspaltung der 17-O-Acetylgruppe (GORMAN et al., 1959; MOZA et al., 1964) war für Vindolin keine chemische Umsetzung zu einem in Frage kommenden Intermediat beschrieben. Auf dem Gebiet der mikrobiologischen Modifizierung von Alkaloiden jedoch ist Vindolin das am besten untersuchte Modell überhaupt. Veranlaßt durch das Interesse an Metaboliten als Ursache für Nebenwirkungen von Vinblastin und Vincristin und durch die Suche nach wirksamen Derivaten (ROSAZZA, 1978) wurden verschiedenste Konversionsprodukte aufgefunden. So fand man Abbau des D-Ringes zum fünfgliedrigen Lactam (NEUSS et al., 1973a), Ausbildung eines intramolekularen Ethers (MALLET et al., 1964), Acetonyladdition an diesen Ether (NEUSS et al., 1973a) und schließlich dessen Dimerisierung (NABIH et al., 1978). Für die beabsichtigte Verwendung der Produkte als Enzymsubstrate waren Demethylierungen an der 11-Methoxygruppe (WU et al., 1978) und N₆-Methylgruppe (NEUSS et al., 1974) interessant.

3.1. O-Demethylierung von Vindolin mit *Sepedonium chrysospermum* ATCC 13378

Die Spaltung einer aromatischen Methoxygruppe an labilen multifunktionellen Alkaloiden ist chemisch nicht zu erreichen, mikrobiell aber oft beschrieben z.B. bei 11-Dimethoxyaporphin (DAVIS et al. 1985), Acronycin (BERTS et al. 1974), 9-Methoxyellipticin (CHIEN und ROSAZZA 1979) und Papaverin (ROSAZZA et al. 1977). Unter den angewandten milden Bedingungen ist das labile Phenolderivat gut zu isolieren. Die Methode von WU et al. (1978) ergibt keine Ausbeute ohne Nebenprodukte.

Sepedonium chrysospermum wurde vom Schrägagar (Sabouraud-Maltose) in einer ersten Kulturstufe auf GY-Medium transferiert und 48 Stunden bei 27 °C mit 250 rpm im Wasserbadschüttler belassen. Die zweite Kulturstufe initiierte man im selben Medium mit 10% Inokulum. Nach 8 Stunden Anpassungszeit wurde 50 mg Vindolin in 0,5 ml Dimethylformamid auf 100 ml Medium zugegeben. Nach weiteren 72 Stunden konnten Medium und Mycel nach Alkalisieren mit Ammoniaklösung pH 9,0 gegen Diethylether ausgeschüttelt werden. Chromatographische Auftrennung auf Kieselgel-Dickschicht im Laufmittel B lieferte aus dem Rückstand der Etherphase 11-O-Demethylvindolin in 80% Ausbeute.

11-O-Demethyl-Vindolin.

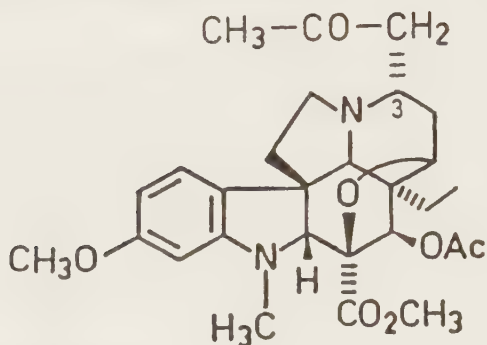


3.2. N_α-Demethylierung von Vindolin und Vindorosin durch *Streptomyces albogriseolus* NRRL 5748

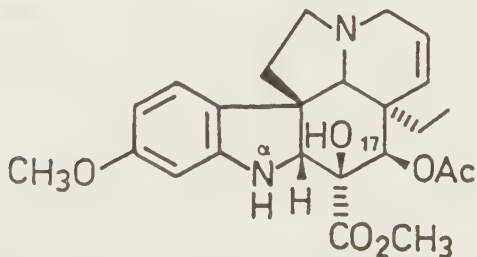
Ebenso schwierig wie die O-Demethylierung ist die N_α-Demethylierung mit chemischen Methoden zu erreichen. Beschrieben ist die oxidative Entmethylierung von Vinblastin in Aceton mit Chrom(VI)-oxid bei -60 °C zu Norvinblastin (JOVANOVIĆ et al., 1974). Diese Vorgehensweise auf Vindolin angewandt führte nicht zu detektierbaren Mengen an N_α-Demethylvindolin. Weiterhin findet sich 17-O-Deacetyl-N_α-Demethylvindolin in der Literatur als Abbauprodukt des kostbaren Vincristin nach Behandlung mit Zinn/Salzsäure (NEUSS et al., 1962), was ebenfalls keinen praktikablen Zugang zu N_α-Demethylvindolin darstellte. Die 17-Hydroxylgruppe konnte anschließend chemisch (II.B.1.1.) nicht ohne Acetylierung des Dihydroindol-Stickstoffes mit Essigsäure verestert werden, die später gefundene enzymatische Acetylierung (III.B.5.) war nicht vorherzusagen.

Dagegen läßt sich N_α-Demethylvindolin durch mikrobielle Umwandlung von Vindolin erhalten (NEUSS et al., 1974). Von einer Kultur von *S. albogriseolus* auf GYM-Agar bei 30 °C wurden ca. 3 cm² Bewuchs abgetragen und auf einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit 60 ml SM-Medium überimpft. Nach 4 Tagen Wachstum (30 °C, 150 rpm) stellte man die Kultur mit 8% Inokulum auf PNZ-Medium um. Dieser zweiten Kulturstufe wurde nach 8 Stunden Anpassung 10 mg Vindolin in 2 ml Ethanol pro 100 ml Kulturmedium zugegeben. 5 Tage später stellte man das Medium mit Salzsäure auf pH 3-4 ein und filtrierte über ein Nylonnetz ab. Anschließend erfolgte die Essigester-Extraktion des mit Ammoniak alkalisierten (pH 10) Filtrats. Chromatographie der organischen Phase auf Kieselgel-Dickschichtplatten in den LM A und D lieferte die zwei in der Literatur beschriebenen Produkte, N_α-Demethylvindolin und Acetonyl-Dihydrovindolinether.

3 α -Acetonyl-Dihydrovindolin-Ether.



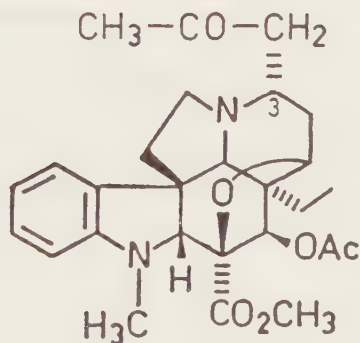
N α -Demethyl-Vindolin.



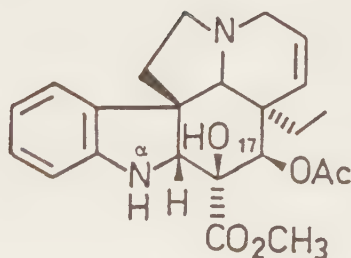
N α -Demethylvindolin konnte mit durchschnittlich 11% Ausbeute chromatographisch rein gewonnen werden.

Vindorosin ist ein Spurensalkaloid aus *Catharanthus roseus* (Moza und Trojanek, 1962), das sich nur durch die fehlende 11-Methoxygruppe vom Vindolin unterscheidet (Moza et al., 1964). Ein analoger Inkubationsansatz mit 1 mg Vindorosin pro 20 ml Medium erbrachte neben Acetonyl-Dihydrovindorosinether N α -Demethylvindorosin in ca. 30% Ausbeute.

3 α -Acetonyl-Dihydrovindorosin-Ether.



N α -Demethyl-Vindorosin.



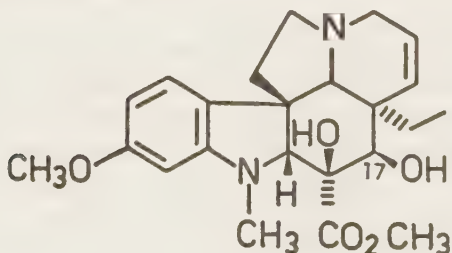
Bemerkenswert ist in beiden Fällen das Auftreten der Nebenreaktion, Addition einer Acetonyleinheit. Diese fand statt, obwohl kein Aceton als Lösungsmittel bei der Substratzugabe verwendet wurde. In letzterem Falle war so zugegebenes Aceton als Reaktionspartner nachgewiesen worden (NEUSS et al., 1973b). Hier jedoch wurde diese Gruppierung von *S. albogriseolus* auch aus einer endogenen Quelle eingeführt.

Applikation von N α -Demethylvindolin an *S. chrysospermum* und von 11-O-Demethylvindolin an *S. albogriseolus* unter den oben beschriebenen Bedingungen ergab keine weitere Umsetzung zum Bisdemethyl-Derivat.

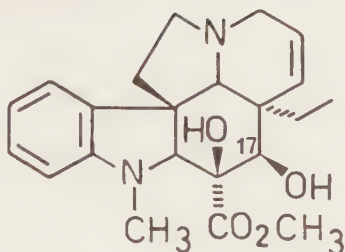
3.3. Deacetylierung an der 17-O-Acetylgruppe

17-O-Deacetylvindolin ist das am leichtesten zugängliche Vindolin-Derivat (MOZA *et al.*, 1964) und läßt sich aus *C. roseus* in Spuren isolieren (GRÖGER *et al.*, 1964). Darüber hinaus erschien es besonders naheliegend als Biosynthese-Intermediat (WESTEKEMPER *et al.*, 1980). So wurden 17-O-Deacetyl-Derivate von Vindolin, Vindorosin und den oben beschriebenen Demethylderivaten hergestellt. Pro eingesetztem mg an Alkaloid gab man 100 µl über Natrium destilliertes Methanol und 10 µl frisch hergestelltes Natriummethylat (ca. 50% v/v Na^o in wasserfreiem Methanol) zu. War nach 8 Stunden bei Raumtemperatur noch keine vollständige Reaktion erfolgt, wurde sie bei 4 °C weiter geführt. Essentiell war die Verwendung von völlig wasserfreiem Methanol besonders für die N_o-Demethylverbindungen, die ansonsten zu den entsprechenden Alkaloidsäuren hydrolysiert wurden. Diese ließen sich auch nur in geringen Ausbeuten (ca. 20%) mit einem Überschuß an Diazomethan wieder verestern, da als Nebenreaktion auch Methylierung an der 17-Hydroxylgruppe beobachtet wurde. Wasserfreie Bedingungen garantierten jedoch, wie bei den anderen eingesetzten Alkaloiden, die quantitative Umsetzung zu den 17-O-Deacetylderivaten:

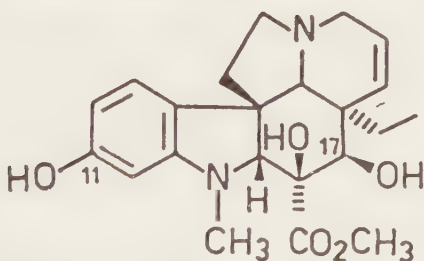
17-O-Deacetyl-Vindolin.



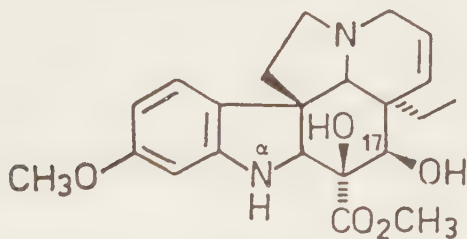
17-O-Deacetyl-Vindorosin.



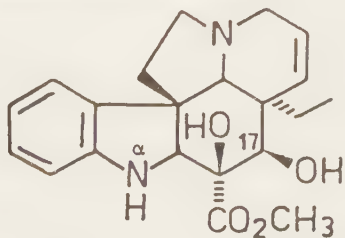
17-O-Deacetyl-11-O-Demethyl-Vindolin.



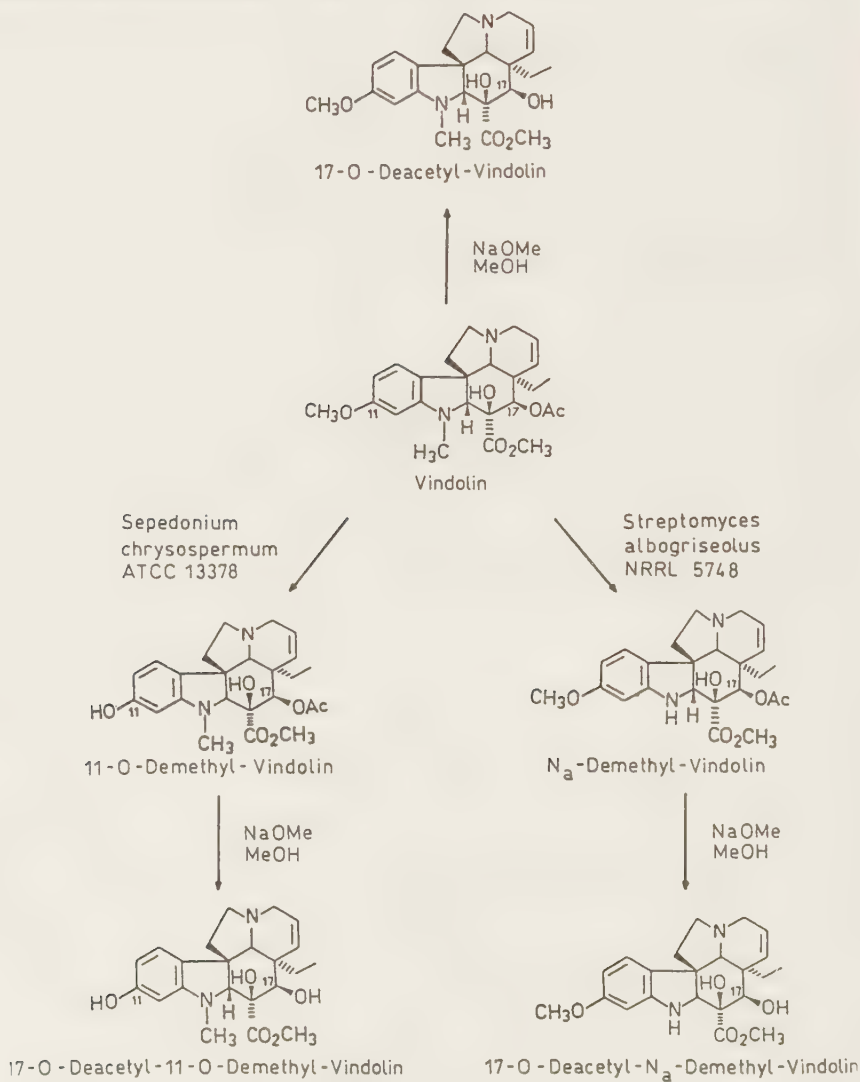
17-O-Deacetyl-N₈-Demethyl-Vindolin.



17-O-Deacetyl-N₈-Demethyl-Vindorosin.



Das Schema 13 verdeutlicht abschließend die durchgeführten Umsetzungen mikrobieller und chemischer Natur.:



Schema 13: Mikrobielle und chemische Schritte zur Darstellung von Biosynthese-Intermediaten ausgehend von Vindolin

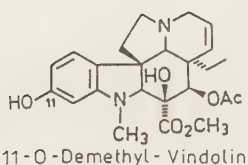
4. Untersuchungen zur enzymatischen N₁- und 11-O-Methylierung mit *Catharanthus*-Enzymen

Durch die Kombination von mikrobiellen und chemischen Methoden (III.B.3.) stand eine Palette von 11-O- und N₁-Demethylderivaten des Aspidosperma-Alkaloids Vindolin zur Verfügung. Diese putativen Intermediate sollten nun eingesetzt werden, um an der Vindolin-Biosynthese beteiligte Enzyme aufzufinden und zu charakterisieren.

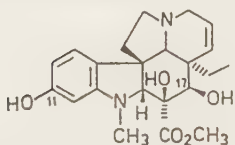
4.1. *In vitro* Umsetzung mit Demethyl-Vindolinderivaten und S-Adenosylmethionin durch *C. roseus* Proteinextrakt

20 g *C. roseus* Blätter wurden frisch eingefroren und zusammen mit 10 g Polyvinylpyrrolidon vermahlen. Dieses Pulver suspendierte man in 30 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7, 20 mM MSH). Nach dem Auftauen verblieb der Aufschluß noch 30 Minuten unter Umrühren in einem Eisbad. Das durch 4 Lagen Windelstoff erhaltene Filtrat zentrifugierte man für 20 Minuten bei 20.000 g. Der Oberstand wurde auf einer mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 vorgespülten Sephadex G 25 Säule gefiltriert. Mit je 0,2 ml der resultierenden Proteinlösung (5 mg Protein/ml) inkubierten je 15 nmol des zu testenden Alkaloids und 1,5 nmol ³H-markiertes SAM (37 kBq/nmol) für 2 Stunden bei 30 °C. Nach Ausschütteln mit Ethylacetat ließ sich die Radioaktivität in der organischen Phase mit der von Kontrollinkubationen mit hitzeinaktiviertem Protein oder ohne Alkaloid vergleichen. Tabelle 3 zeigt die Auswertung dieser Suche.

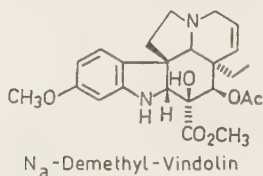
Substrat	Umsetzung	SAM	%
----------	-----------	-----	---



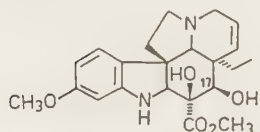
< 0,1



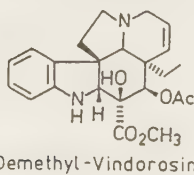
5



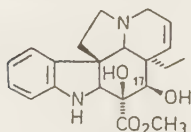
< 0,1



< 0,1



< 0,1



< 0,1

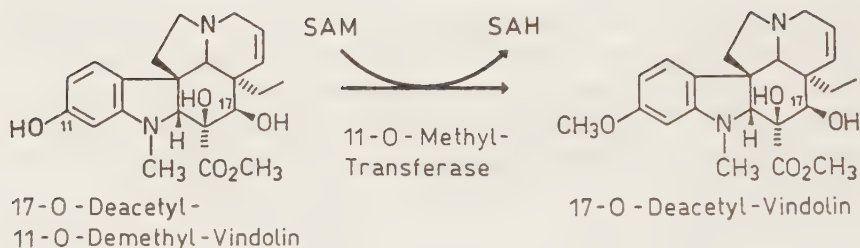
Tabelle 3: Enzymatischer Umsatz von markiertem SAM

Eine N_6 -Methylierung konnte auch mit einem Pellet von obiger Zentrifugation, bei Aufschluß ohne β -Mercaptoethanol und mit einer Mikrosomenfraktion nach DIESPERGER et al. (1974) nicht erzielt werden. Insbesondere die fehlende Akzeptanz von N_6 -Demethyl-17-O-Deacetylvindorosin als Substrat spricht für eine N_6 -Methylierung in einem früheren Stadium der Biosynthesesequenz.

Die ebenfalls wie oben abgesicherte Spezifität der 11-O-Methyltransferase für die 17-O-Deacetylverbindung weist der 17-O-Acetylierung einen Platz hinter der N_6 -Methylierung zu.

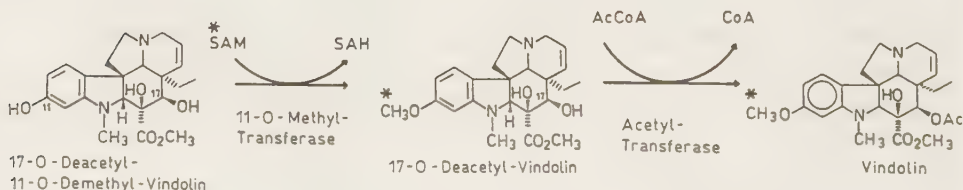
4.2. Zellfreier enzymatischer Umsatz von 17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin

Der Umsatz von radioaktiv markiertem SAM bei Einsatz von 17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin mußte noch eindeutig einer Methyltransferase-Aktivität zugeordnet werden. So wurden 80 μ g 17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin (250 nmol) in 50 μ l Aceton gelöst zu einer Inkubation mit 8,5 mg Protein (Aufschluß wie in B.III.4.1.) beschrieben) und 3 mg SAM (4,5 μ mol) in 3 ml Kaliumphosphat-Puffer 0,1 M pH 8 gegeben. Nach 2 Stunden bei 30 °C folgte Extraktion mit 3 ml Ethylacetat. Der Essigester wurde abgezogen und der Rückstand auf einer Dünnschichtplatte im LM A chromatographiert. Über 11-Demethyl-17-O-Deacetylvindolin (R_f 0,1) war im UV 254 nm ein Reaktionsprodukt mit R_f 0,3 zu erkennen. Nach Elution der Kieselgelzone ergab diese Verbindung UV- und Massenspektren, die mit von 17-O-Deacetylvindolin ermittelten (III.B.3.3.) identisch waren. Gebildet worden waren ca. 20 μ g 17-O-Deacetylvindolin (ca. 25%, $\epsilon_{300} = 3,76$). Schema 14 veranschaulicht die enzymatische Umsetzung.



Schema 14: Enzymatische 11-O-Methylierung

Durch Derivatisierung des Reaktionsprodukts konnte die erfolgte enzymatische Methylierung weiter abgesichert werden. Die Inkubation wurde mit 30 nmol 17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin und 1 mg Protein in Anwesenheit von 30 nmol ^3H -SAM (56,6 kBq) wiederholt. Dann erfolgte die Zugabe von 0,4 nkat 17-O-Acetyltransferase (1,2 nkat/mg; III.B.5.1.) und 1,2 μmol AcetylCoA in 0,2 ml Puffer. Nach weiteren 2 Stunden extrahierte man den Enzymsatz mit Essigester. Die Essigesterphase wurde eingeeengt und zusammen mit 5 μg Vindolin auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach Entwicklung im LM D ließ sich die Radioaktivitätsverteilung ermitteln. Vindolin zeigte deutlich eine Markierung. Somit stand die Beteiligung der Methyltransferase an der Bildung von Vindolin fest. Die dabei erfolgten enzymatischen Schritte zeigt nochmals Schema 15.



Schema 15: Enzymatische Derivatisierung des primären Methylierungs-Produktes 17-O-Deacetylvindolin zu Vindolin

5. Untersuchungen zur enzymatischen 17-O-Acetylierung bei der Vindolin-Biosynthese

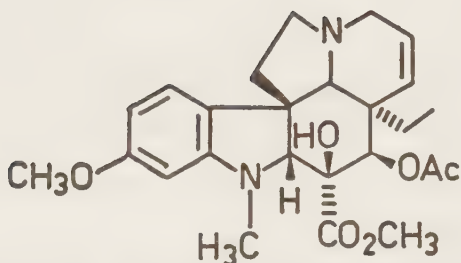
Zur Suche nach einem Enzym der Vindolinbiosynthese war 17-O-Deacetylvindolin als einfachstes Vindolinderivat (GORMAN et al., 1959) prädestiniert. Die Notwendigkeit von AcetylCoA als Cofaktor für eine mögliche Reaktion zum Vindolin war ebenfalls leicht einsichtig und bereits von WESTEKEMPER et al. (1980) postuliert worden.

5.1. Zellfreier Umsatz von 17-O-Deacetylvindolin zu Vindolin

20 g Blätter von *Catharanthus roseus* Pflanzen wurden nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff vermahlen und in 20 ml Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 aufgetaut. Nach einer Stunde, während der der Aufschluß im Eisbad weiter umrührte, filtrierte man durch vier Lagen Windelstoff ab und unterwarf das Filtrat 20 Minuten lang einer Zentrifugation bei 20.000 g.

Aus dem erhaltenen Überstand wurde Protein durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer 70%igen Sättigung präzipitiert. Der erneut abzentrifugierte Niederschlag ging in 5 ml Aufschlußpuffer wieder in Lösung und wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex G 25 Säule von Salzen, endogenen Alkaloiden und Cofaktoren befreit. Aus diesem Rohextrakt inkubierte man 4,3 mg Protein in 1 ml Puffer mit 6 nmol AcetylCoA und 140 nmol (58 µg) 17-O-Deacetylvindolin 2 Stunden bei 30 °C. Beendet wurde die Reaktion durch Extraktion dieses Ansatzes mit 1 ml Essigester. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand der organischen Phase über DC im Laufmittel D aufgetrennt. Mit einem R_f von 0,7 wurde das gebildete Reaktionsprodukt von der Ausgangsverbindung (R_f 0,6) unterschieden und nach Elution als Vindolin (2,5 µg, $\epsilon_{304} = 3,71$) identifiziert.

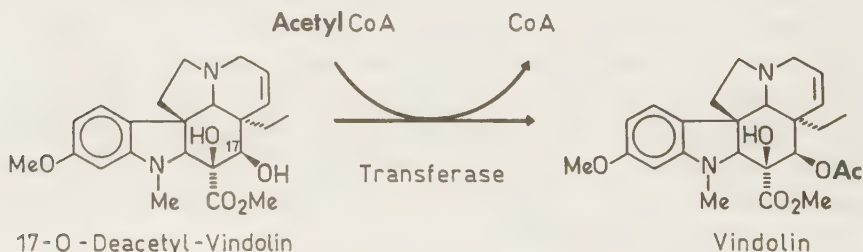
Vindolin.



Identische Daten waren mit Referenzproben von Vindolin zu ermitteln. Die Reaktion ließ sich in Abwesenheit von AcetylCoA und mit hitzedenaturiertem Protein nicht beobachten.

5.2. Enzymtest für die 17-O-Acetyltransferase

Zum einfachen, schnellen und empfindlichen Test der Acetyltransferase-Aktivität bot sich der Einsatz von radioaktiv markiertem Acetyl-Coenzym A an. Durch Extrahieren der Inkubation mit Essigester wurde die Reaktion beendet. Dabei verteilte sich beim vorliegenden leicht alkalischen pH-Wert unverbrauchtes AcetylCoA in die wässrige, gebildetes markiertes Alkaloid in die organische Phase. In einem Aliquot des Ethylacetats gemessene Radioaktivität konnte so in stöchiometrischen Umsatz umgerechnet werden. Schema 16 beschreibt diese Verhältnisse.



Schema 16: Radioaktiv markiertes Vindolin als Enzymprodukt

Für die Berechnung einer spezifischen Enzymaktivität waren unter Standard-Testbedingungen ein linearer Verlauf der Reaktion bezüglich Zeit und Proteinmenge erforderlich. Folgender Testansatz erfüllte diese Voraussetzungen: In 0,2 ml

Hepes-Na Puffer pH 8,0 wurden 30 nmol ^3H -markiertes AcetylCoA (155 Bq/nmol), 10 nmol 17-O-Deacetylvindolin und 20 μg BSA mit 0,5 - 1 pkat Acetyltransferaseaktivität 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion stoppte auf Zugabe von 0,5 ml Essigester. Nach 10 Minuten im Schüttler (Eppendorf) wurden 5 Minuten lang in einer Eppendorf-Zentrifuge die beiden Phasen getrennt. Nun nahm man 350 μl Ethylacetat ab und maß die extrahierte Radioaktivität im Szintillations-Zähler. Kontrollwerte wurden ebenso, jedoch in Abwesenheit von 17-O-Deacetylvindolin, ermittelt.

5.3. Zugehörigkeit der 17-O-Acetyltransferase zu den Enzymen der Vindolin-Biosynthese

Neben der Substratspezifität (III.B.5.5.5.) ist ein nur gemeinsames Auffinden von Enzym und Enzymprodukt oder dessen Metaboliten ein Hinweis auf die Bedeutung eines Enzyms für den untersuchten Syntheseweg. Dieser gegenseitige Zusammenhang konnte in *Catharanthus roseus*-Pflanzen und -Zellkulturen demonstriert werden.

5.3.1 Verteilung der 17-O-Acetyltransferase in differenzierten Pflanzen von *C. roseus*

Wie das Beispiel von Hyoscyamin in *Atropa belladonna* zeigt, ist der Ort der Alkaloid-Biosynthese nicht zwingend auch das Pflanzenorgan, in dem das Produkt akkumuliert. Doch ein Zusammentreffen von Bildung und Speicherung ist ein weiteres Indiz für die Korrelation der in diesem Pflanzenteil angetroffenen Enzyme mit der entsprechenden Biosynthese.

Um dies in *Catharanthus roseus*-Pflanzen zu untersuchen, wurden je 40 g Wurzeln, Stengel und Blätter unter flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einer Schlagmessermühle (IKA M20) vermahlen und in je 50 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 mit 10 mM MSH bis zum Auftauen gerührt. Ein Filtrat, erhalten durch drei Lagen Windelstoff, zentrifugierte man 20 Minuten bei 20.000 g. Der Überstand wurde über eine Sephadex G 25 Säule, vorgespült mit Puffer ohne MSH, gelfiltriert. So ergaben sich 350 mg Protein aus den Blättern, 53 mg aus den Stengel und 43 mg aus den Wurzeln. Je 50, 100 und 150 μg

Protein aus dem jeweiligen Pflanzenorgan inkubierten mit 30 nmol ^3H -AcetylCoA (155 Bq/nmol) und 25 nmol 17-O-Deacetylvindolin in 0,3 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 für 15 Minuten bei 30 °C. Leerwerte wurden mit je 100 µg hitzeinaktiviertem Protein angesetzt. Zum Abstoppen und Extrahieren der Inkubations-Mischungen gab man 0,5 ml Ethylacetat zu und bestimmte die in 350 µl Essigester erfaßte Radioaktivität. Errechnet wurden 40 pkat/mg Blatt-, 20 pkat/mg Stengel- und weniger als 0,1 pkat/mg Wurzelprotein an Acetyltransferase-Aktivität. Diese Verteilung spiegelt auch die von Vindolin in *C. roseus* Pflanzen wider (WESTEKEMPER et al., 1980). Die untersuchte Enzymaktivität beschränkt sich auf photosynthetisch aktive Pflanzenteile.

5.3.2. Vorkommen der Acetyltransferase in Zellkulturen von *C. roseus*

Da in den zur Verfügung stehenden Zelllinien von *C. roseus* Suspensionskulturen kein Vindolin aufgefunden wird, war es von besonderem Interesse, ob etwa die Acetyltransferase nicht trotzdem in den kultivierten Pflanzenzellen exprimiert sein würde; ein negatives Ergebnis konnte die Beziehung dieses Enzyms zur Vindolin-Biosynthese untermauern.

Suspensionen mehrerer Catharanthus-Zelllinien (MT 55, RT 71 und SR 28) wurden nach 5 Tagen Wachstum abgeerntet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit gleichen Gewichtsteilen 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 und 10 mM MSH bis zum Auftauen des Zellmaterials umgerührt. Anschließend trennte man grobe Zelltrümmer durch vier Lagen Windelstoff ab. Nach Zentrifugation über 20 Minuten bei 20.000 g wurde Ammoniumsulfat bis zu 70% Sättigung zugefügt und nochmals zentrifugiert. Der Proteinniederschlag ließ sich in Aufschlußpuffer wieder lösen und über Sephadex G 25 mit Puffer ohne MSH entsalzen. Ebenso wurde ein Proteinextrakt aus gefroren vermahlenen *C. roseus* Blättern hergestellt. Acetyltransferase-Aktivität sollten je 0,3 mg Zellkultur-Protein und 50 µg Protein aus den Blättern zeigen. Diese Inkubationen bestanden außerdem aus 26 nmol ^3H -AcetylCoA (178 Bq/nmol) und 25 nmol 17-O-Deacetylvindolin in einem

Gesamtvolumen von 0,4 ml Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Nach 2 Stunden bei 30 °C wurde die Radioaktivität in dem Essigester-Extrakt der Inkubationen bestimmt. Diese wurde auf Kontrollwerte mit hitzedenaturiertem Protein bezogen. Während in den Blättern 250 pkat Transferase-Tätigkeit pro mg Protein zu verzeichnen war, zeigten die Zellkulturen keine solche Umsetzung (< 50 fkat/mg Protein). Auch hier ergab sich eine Korrelation von Sekundärstoffgehalt und der Fähigkeit, einen Schritt der Biosynthese dieses Alkaloids auszuführen.

5.3.3. Unspezifische Esteraseaktivität für Vindolin in *C. roseus* Pflanzen und Zellkulturen

Bei Verwendung von Proteinextrakten aus *C. roseus* Zellkulturen konnte keine *in vitro*-Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin detektiert werden. Um eine auch nur geringe Acetyltansferase-Aktivität sicher ausschließen zu können, mußte noch eine störende Fremdaktivität berücksichtigt werden. Dazu wurde das Schicksal des fraglichen Enzymprodukts in Gegenwart von Zellkultur-Protein untersucht.

Zunächst wurde Vindolin an die Zelllinie SR 28 appliziert. Sechs Tage nach der Fütterung mit 2 mg Vindolin ($4,4 \mu\text{mol}$) in 1 ml Ethanol an 300 ml Zellsuspension filtrierte man die Zellsuspension ab. Das Gewebe wurde unter flüssigem Stickstoff eingefroren und mit 250 ml Ethylacetat und 0,5 ml Ammoniaklösung (10%) einen Tag lang unter Umrühren extrahiert. Anschließend konnte der Essigester abfiltriert und mit 20 ml Wasser gewaschen werden. Der organischen Phase entzog man die Alkaloide mit 100 ml 2% Schwefelsäure. Die Schwefelsäure wurde wiederum mit Ammoniaklösung auf pH 9 alkalisiert und gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Der Rückstand nach Abziehen des Lösungsmittels ließ sich dünnschichtchromatographisch auftrennen (LM D). Unter der Vindolinbande (R_f 0,7) war entstandenes 17-O-Deacetylvindolin (R_f 0,6) im UV 254 nm zu detektieren. Nach Elution dieser Bande wurde das Produkt photometrisch bestimmt ($\epsilon_{205} = 3,76$) und seine Identität massenspektroskopisch sichergestellt. Vindolin war zu 35% zu 17-O-Deacetylvindolin ($1,5 \mu\text{mol}$) umgesetzt worden.

Kohlesuspension wurden die Inkubationen wie oben weiterverarbeitet. Nach Abzug der Blindwerte mit gekochtem Protein resultierte enzymatische Deacetylierung von 25 fkat/mg Protein aus Blatt, 25 fkat/mg aus Stengel und 60 fkat/mg aus Wurzel. Danach sind die Esterase-Werte nicht mit dem Vindolingehalt der entsprechenden Pflanzenteile verknüpft, im Gegensatz zur Verteilung der Acetyltransferase-Aktivität. Abbildung 39 faßt diese Beziehungen zusammen.

Den direkten Vergleich der Tätigkeit von Esterase und Acetyltransferase in *C. roseus* Blättern erbrachte ein Parallel-Versuch mit Proteinrohextrakt (III.B.5.3.1.). Für die Acetyltransferase wurde in 0,4 ml Kaliumphosphat (0,1 M, gepuffert bei pH 8,0) 5 µg Protein mit 2,3 nmol 17-O-Deacetylvindolin und 20 nmol ³H-AcetylCoA (230 Bq/nmol) 30 Minuten bei 30 °C inkubiert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Im selben Puffervolumen zeigten 1,5 mg Protein mit 3 nmol ³H-AcetylCoA (5,5 kBq; II.B.1.5.) unter den gleichen Bedingungen ihre Esterase-Aktivität. Dieser Ansatz wurde mit 0,1 ml Kohlesuspension gestoppt. Ausgewertet ergab sich ein Verhältnis von 205 pkat/mg Protein Transferase zu Esterase mit 14,4 fkat/mg spezifischer Aktivität. Sowohl bei Betrachtungen zum Vindolin-Metabolismus in der Pflanze als auch im Standardtest (II.B.5.2.) durfte diese Esterase-Aktivität somit vernachlässigt werden.

5.3.4. Deacetylierung von Vindolin durch verschiedene Enzymsysteme

Bisher war die Abspaltung der 17-O-Acetylgruppe durch Proteinextrakt von *C. roseus* Pflanzenteilen und Zellkulturen demonstriert worden. Dabei hatte die Esteraseaktivität jedoch nicht zur Voraussetzung, daß die entsprechende Quelle einen Gehalt an Vindolin aufwies. Um die Spezifität einer solchen Umsetzung zum Deacetylderivat zu beurteilen, wurden verschiedene fremde Enzymsysteme auf Esterase-Aktivität geprüft. Präparationen aus Leber sind dabei eine hervorragende Quelle für das Studium verschiedenartiger Reaktionen an Alkaloiden (HOLLAND, 1981).

Enzymaktivität
Transferase

Enzymaktivität
Esterase

34,4 pkat/mg

25 fkat/mg

17,8 pkat/mg

25 fkat/mg

nicht detektierbar

60 fkat/mg

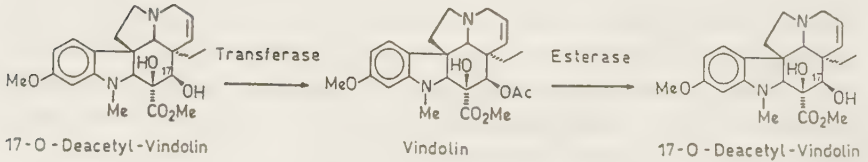


Abb. 39: Verteilung der Acetyltransferase und -esterase in *C. roseus* Pflanzen

Leberaceton-Pulver verschiedener Tierarten wurden zu je 50 mg in 0.75 ml 100 mM Kaliumphosphat pH 8,0 suspendiert. Zusammen mit 100 µg Vindolin (220 nmol) inkubierten diese Ansätze unter gelegentlichem Umschütteln einen Tag bei 30 °C. Nach Extraktion mit Dichlormethan trennte man den gesamten Rückstand der organische Phase über DC im Laufmittel D auf. Die Umsetzung zu 17-O-Deacetylvindolin wurde im UV 254 nm semiquantitativ durch die Fluoreszenzlöschung beurteilt.

<u>Leberacetonpulver von:</u>	<u>Deacetylierung ca.:</u>
Pferd	<1%
Ratte	100%
Kalb	5%
Schwein	30%
Taube	100%
Schildkröte	<1%
Huhn	<1%
Wal	<1%

Ebenso ließ man die Schweineleber-Esterase EC 3.1.1.1. mit einer Aktivität von 2,2 µkat (bezogen auf Buttersäure-Ethylester) in 1 ml Puffer reagieren. Nach 10 Stunden war vollständige Acetyl-Abspaltung nachzuweisen. Diese Reaktion war auch präparativ nutzbar (II.B.1.3.).

Offensichtlich ist die Hydrolyse der Acetylester-Gruppierung in Vindolin keine spezifische Leistung von Catharanthus-Enzymen.

5.4. Reinigung der 17-O-Acetyltransferase

Zellkulturen besitzen vielfältige Vorteile für die Isolierung von Sekundärstoffwechsel-Enzymen. So steht diese sich regenerierende Quelle ganzjährig zur Verfügung, und dies bei standardisierbar optimierten Kultur- und Erntebedingungen. Auch besteht Auswahlmöglichkeit von Zelllinien. Des weiteren bieten die Aufschlußmethodik ohne weitere mechanische Manipulation und schließlich verminderte Beeinträchtigung der

Proteinextrakte durch Phenole, Phenolasen, Chlorophyll und Enzyme der CO₂-Fixierung Erleichterungen gegenüber der Arbeit mit differenzierten Pflanzen. Leider konnte aus Zellkulturen von *Catharanthus roseus* keine Acetyltransferase gewonnen werden. Auch war die Biosynthese von Vindolin bisher in einer einzigen *Catharanthus*-Art untersucht worden. Ausgangsmaterial waren deshalb Blätter (III.B.5.3.1.) von *C. roseus*.

5.4.1. Proteinextrakt aus *C. roseus* Blättern

2,5 kg Blätter wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und noch gefroren in einer Schlagmesser-Mühle (IKA M20) in Portionen vermahlen. Das Blattpulver ließ man in insgesamt 1,6 l 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 mit 20 mM MSH und 1 mM EDTA unter Umrühren im Wasserbad bei 35 °C auftauen. Der verflüssigte Aufschluß rührte weitere 30 Minuten im Eisbad um, bevor er durch drei Lagen Windelstoff filtriert wurde. Nach intensivem Abpressen von den Blattresten unterzog man das Filtrat einer ersten Zentrifugation über 20 Minuten bei 20.000 g. Der Überstand ergab einen Rohextrakt, der mit 2% Protaminsulfatlösung (mit Tris neutralisiert) auf ein Verhältnis von 350 mg Protaminsulfat pro Gramm Protein eingestellt wurde. Zum vollständigen Ausfällen von Nucleinsäuren, stark sauren Proteinen und Chlorophyll rührte man den Extrakt weitere 15 Minuten bei 0 °C um. Anschließend wurde er ein zweites Mal zentrifugiert und der Überstand unter Rühren über 30 Minuten mit frisch gemahlenem Ammoniumsulfat bis zur 40%igen Sättigung versetzt. Nach einer Viertelstunde, in der vorzeitig präzipitierte Proteine wieder in Lösung gehen konnten, fand ein dritter Zentrifugationsschritt statt. Jetzt konnte die verbliebene Proteinlösung auf 70% Ammoniumsulfatsättigung gebracht werden. Der resultierende Proteinniederschlag wurde durch eine vierte Abtrennung bei 20.000 g erhalten. Der Arbeitsgang beanspruchte, vor allem wegen des zeitraubenden Abstreifens der Blätter von der Sprossachse und der limitierenden Zentrifugenkapazität, ausgehend von bereits geerntetem *C. roseus* Kraut 18 Stunden.

Den fraktioniert gefällten Ammoniumsulfat-Niederschlag suspendierte man in 150 ml Aufschlußpuffer. Diese Suspension wurde unter Oxidationsschutz (20 mM β -Mercaptoethanol) gegen 15 l 10 mM Tris·HCl pH 7,5 und 1 mM EDTA dialysiert. Im Anschluß daran konnte das Volumen der Proteinlösung auf ca. 60 ml eingeengt werden, indem der Dialyseschlauch in gemahlenes Polyethylenglykol 20.000 eingelegt wurde. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 40.000 g folgte eine Gelfiltration, die in drei Fraktogel TSK HW 45 F Säulen 2 x 25 cm stattfand, die mit 20 mM Hepes-Na pH 7,5 und 1 mM DTE vorgespült waren. Die so entsalzte Proteinlösung wurde in insgesamt 100 ml aufgefangen.

5.4.2. Affinitätschromatographie der Acetyltransferase an Procion Red H-3B substituiertem Fraktogel TSK HW 65 F

Affinitätschromatographie als hochauflösende Methode der Proteinreinigung beruht auf der spezifischen Wechselwirkung eines an der Chromatographie-Matrix immobilisierten Liganden mit einem durch dessen Struktur angesprochenen Protein. Neben solchen Liganden, die aus der biologischen Aktivität des Proteins abzuleiten sind, erwiesen sich auch Farbstoff-Moleküle als empirisch ermittelbare Adsorptionsvermittler (HAECKEL *et al.*, 1968). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von Triazin-Farbstoffen mit Nucleotid-Cosubstraten wurde auch eine spezifische Struktur des Proteins als Voraussetzung einer Bindung diskutiert (THOMPSON *et al.*, 1975). Es gibt jedoch genügend Beispiele für in diesem Zusammenhang nicht vorhersehbare Wechselwirkungen (LOWE und PEARSON, 1984), allen voran die Adsorption von Rinder Serum-Albumin.

Auf dieser rein empirischen Grundlage wurde aus einer Reihe von Farbstoffen (Amicon dyematrex screening kit) derjenige mit den besten Ad- und Desorptions-Eigenschaften ausgewählt und immobilisiert (II.B.3.1.).

In den meisten Proteinreinigungs-Protokollen wird Affinitäts-Chromatographie erst in späteren Stadien eingesetzt (BONNERJEA *et al.*, 1986). Oftmals sind Nachteile von Chromatographie-Medien mit Liganden aus biologischem Material dafür

verantwortlich. So lassen sich enzymatische Veränderung durch rohe Proteingemische sowie Instabilität bei drastischeren Regenerationsbedingungen beobachten. Auch hohe Materialkosten bei beschränkter Kapazität sind Gründe, die gegen den Einsatz solcher Medien zum Auftrennen ungereinigter Proteinextrakte sprechen. Dagegen sind Farbstoffssäulen mit ihrer chemischen Stabilität des Liganden und preiswerter Herstellung bei hohem Adsorptionsvermögen gerade auch für die Auftrennung größerer Mengen Proteinrohextrakt geeignet (ATKINSON *et al.*, 1981). Mit der Matrix Fraktogel wurde zudem ein besonders inertes Trägermaterial gewählt. Problemlos konnte das Medium mit 8 M Harnstofflösung unter Entfernen von gebundenem Protein, Lipid und abdissoziiertem Farbstoff regeneriert werden.

Auf eine so vorbehandelte Farbstoffsäule der Dimension 5 cm x 34 cm, die anschließend mit 3 Gelbettvolumina 20 mM Hepes-Na pH 7,5 mit 1 mM DTE äquilibriert worden war, gab man den in III.B.5.4.1. gewonnenen Extrakt mit einer Flußrate von 6 ml/Stunde auf. Diese niedrige Pumpgeschwindigkeit war erforderlich, um eine Adsorption der Acetyltransferase zu erreichen. Zur Elution von ungebundenem Protein wurde die Säule mit 15 ml pro Stunde nachgewaschen. Desorption der Enzymaktivität konnte bereits durch einen Wechsel auf 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 und 1 mM DTE erreicht werden. Mit 50 ml/Stunde Durchflußrate wurde dieses Eluat in Fraktionen zu 6 ml aufgefangen. Von diesen testete man mit je 10 µl für 45 Minuten bei 30 °C auf Transferase. Die Inkubationen bestanden aus 6 nmol ³H-AcetylCoA (155 Bq/nmol), 10 nmol 17-O-Deacetylvindolin und 20 µg BSA in insgesamt 0,1 ml Hepes-Na Puffer (0,1 M, pH 8,0). Abbildung 40 stellt das erhaltene Elutionsprofil dar. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und das Volumen (1 l) im Dialyseschlauch gegen Polyethylenglykol 20.000 auf 60 ml eingeengt.

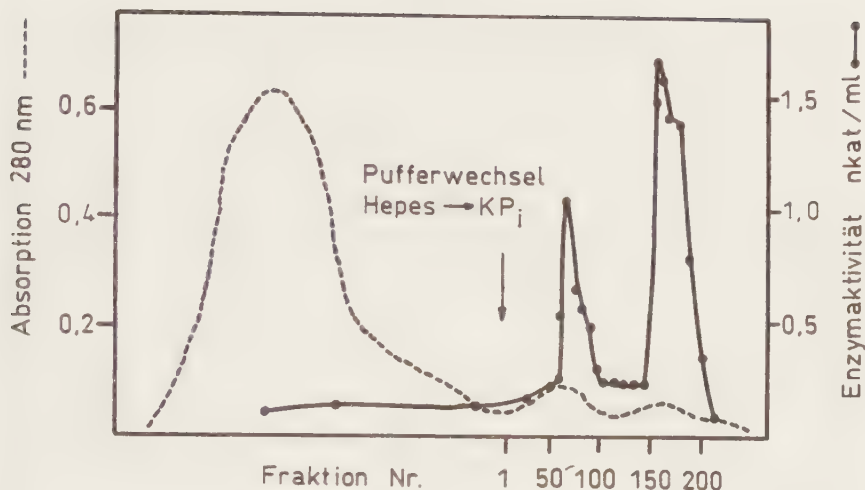


Abb. 40: Elution der Acetyltransferase an der Farbstoffsäule

5.4.3. Affinitätschromatographie der Acetyltransferase an Coenzym A-substituiertem Fraktogel TSK HW 65 S

Für einen weiteren Affinitätschromatographie-Schritt wurde ein spezifischerer Ligand benötigt. Nachdem Immobilisierung des Alkaloid-Substrates über Azokupplung und Säureamidbindung nicht zu brauchbaren oder reproduzierbar trennenden Chromatographie-Medien geführt hatte, wurde Kopplung des Cosubstrates in Erwägung gezogen. Da auch Coenzym A zur Rückreaktion an das Enzym binden muß (III.B.5.5.6.), wurde aus Stabilitätsgründen dieses gewählt und an der Matrix fixiert (II.B.3.3.). Die dauerhafte Immobilisierung über Thioether-Bindung sorgte für ein reproduzierbares Elutionsprofil, die dabei erzielte CoA-Konzentration (ca. 60 facher K_m der Acetyltransferase) für ausreichende Bindung und Kapazität.

Das eingeeengte Eluat der Farbstoffsäule wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 ml/Stunde auf die mit demselben Puffer vorgespülte Säule (1,6 x 10 cm) gegeben. Nach Auswaschen ungebundenen Proteins eluierte man die Transferase-Aktivität mit einem KCl-Gradienten. Die Salzkonzentration steigerte sich über den Zeitraum von 4 Stunden linear von 0 auf 0,5 M

Kaliumchlorid. Währenddessen wurde der Säulen-Durchlauf zu je 1 ml fraktioniert. Mit je 5 µl Eluat inkubierte man die Enzymtest-Ansätze (siehe III.B.5.2.) 15 Minuten bei 30 °C. Aus diesem Chromatographie-Schritt resultierte eine Auftrennung wie in Abbildung 41 verdeutlicht. Die Acetyltransferase-Aktivität fand sich in einem Gesamtvolumen von 80 ml wieder.

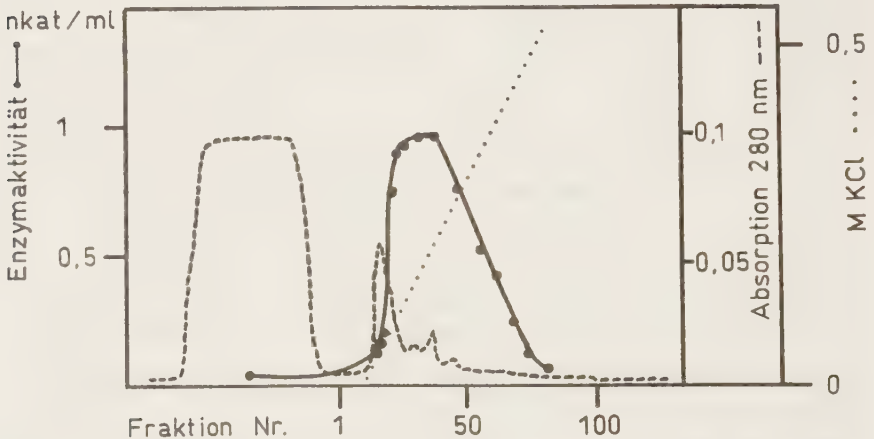


Abb. 41: Elution der Acetyltransferase an der CoA-Säule

5.4.4. Hydrophobe Chromatographie an 2-Hydroxy-3-phenoxypropyl-substituiertem Fraktogel TSK HW 65 S

Als eine weitere Eigenschaft von Proteinen sollten unterschiedliche Wechselwirkungen mit einer hydrophoben Matrix zur Reinigung genutzt werden. Da die Transferase an Phenylsepharose keine und an Octylsepharose zu starke Bindung gezeigt hatte, wurde das benötigte Medium zur hydrophoben Chromatographie selbst hergestellt (II.B.3.4.).

Die aus dem zweiten Affinitätsschritt erhaltene Proteinlösung stellte man auf 5 mM DTE-Konzentration und 40% Ammoniumsulfat-Sättigung ein. Die hydrophobe Säule (1,6 x 7 cm) wurde ebenfalls mit 1,6 M Ammoniumsulfat im 20 mM Phosphat-Puffer pH 7,4, 1 mM DTE äquilibriert. Die Aufgabe der Proteinlösung erfolgte mit 20 ml/Stunde, nichtadsorbiertes Protein wurde mit Äquilibrierungs-Puffer ausgewaschen. Ohne Ammoniumsulfat im

Puffer eluierte man das gebundene Protein mit 10 ml/Stunde und fing Fraktionen zu je 0,8 ml auf. Aus diesen wurden je 2 μ l Eluat mit 18 nmol ^3H -AcetylCoA (52 Bq/nmol), 20 nmol 17-O-Deacetylvindolin und 20 μ g BSA in 0,1 ml Hepes-Na Puffer (pH 8, 0,1 M) 5 Minuten bei 30 °C auf Acetyltransferase-Aktivität getestet. Die Abbildung 42 demonstriert, daß eine Reinigung hauptsächlich durch eine Abtrennung nicht gebundenen Proteins erfolgte. Auch linear ansteigender Ethylenglykol-Konzentration führten zu keiner weiteren Auftrennung. Das Gesamtvolumen der Transferase-Lösung war nun 8 ml. Der Wert dieses Chromatographie-Schrittes bestand also größtenteils auch in einer Volumenverminderung.

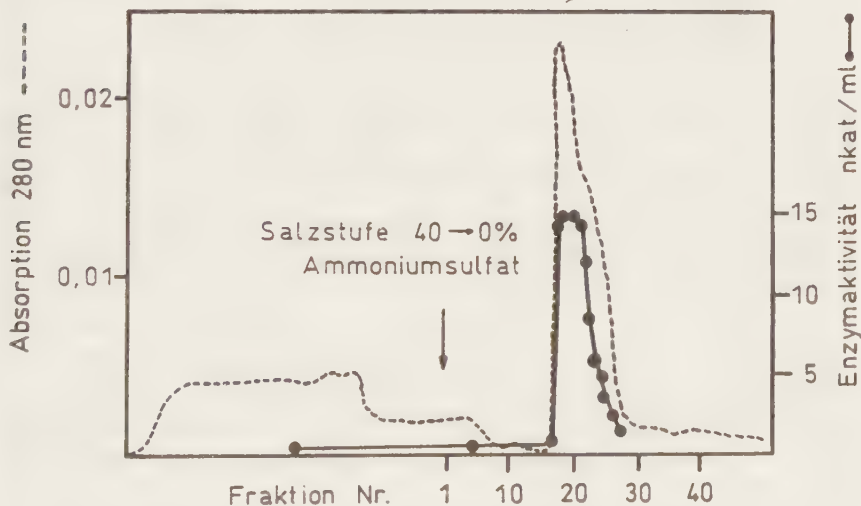


Abb. 42: Elution der Transferase an der hydrophoben Säule

5.4.5. Präparative Trägerampholyt-Isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel

Bei dieser Trennmethode macht man sich Unterschiede in den isoelektrischen Punkten der zu trennenden Proteine zunutze. Dabei verbinden sich höchste Auflösung mit einer Konzentrierung auf kleine Volumina. Trennung nach Größe (siehe auch III.B.5.5.2.) und Ladungsdichte erbrachte auf dieser

Stufe der Reinigung keine Anreicherung des Enzyms mehr. So wurde die Heterogenität hinsichtlich der pI-Werte in der Protein-Mischung für eine weitere Auftrennung in Anspruch genommen.

Zunächst mußte für die Fokussierung die nach hydrophober Chromatographie gewonnene Enzympräparation entsalzt werden. Dazu wurde gegen zweimal 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 und 2 mM DTE und schließlich einmal 2 mM DTE-Lösung dialysiert. Den Dialyse-Schlauch ließ man anschließend so lange in 40% w/v Lösung von Polyethylenglykol 20.000 eingelegt, bis sich das Volumen auf ca. 300 µl vermindert hatte. Diese Protein-Präparation wurde mit 20 µl Ampholytlösung (Servalyte 4-9T) aufgenommen und wie bei II.B.5.6. beschrieben auf das Flachbettgel appliziert. Der Celluloseacetat-Abdruck des ausfokussierten Gels zeigte 6 deutliche Banden. Diese wurden gesondert durch Abtragen der Gelschicht von der Trägerplatte gewonnen. Weitere Fraktionen teilte man nach festem Raster in Gelstreifen von 5 mm Breite zur Laufrichtung. Die so erhaltenen Segmente suspendierte man in je 0,5 ml Wasser und setzte je 2 µl Überstand des Gels zum Enzymtest auf Acetyltransferase ein. Dieser bestand aus 6 nmol ^3H -AcetylCoA, 10 nmol 17-O-Deacetylvindolin und 20 µg BSA in 0,1 ml 100 mM Hepes-Na pH 8,0. Nach 5 Minuten Inkubationsdauer konnte die Verteilung der Transferase-Tätigkeit im Gel festgestellt werden. Wie aus Abbildung 43 ersichtlich, stellten fünf der zu erkennenden Banden Proteinspezies mit Acetyltransferase-Aktivität dar. Die entsprechenden Gelfractionen wurden wie unter II.B.5.7. geschildert eluiert.

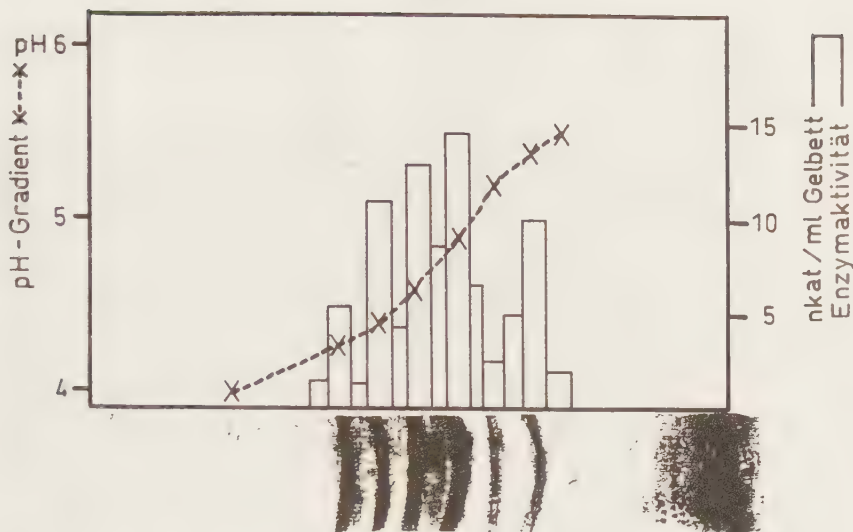


Abb. 43: IEF der Acetyltransferase; über dem Gel-Abdruck sind pH-Gradient und Aktivitäts-Profil abgebildet

Die Tabelle 4 faßt die Reinigungsschritte und die erfolgte Anreicherung zusammen.

Die Fraktionen der isoelektrischen Fokussierung verloren, gelagert bei 0 °C, innerhalb von zwei Wochen die Hälfte ihrer Enzymaktivität.

Als Homogenitäts-Kriterien für Proteine sind neben einheitlichem pI auch Reinheit in der SDS-Elektrophorese zu fordern (SCOPES, 1983). Abbildung 44 besteht aus dem Elektropherogramm verschiedener Reinigungsstufen.

Wie in III.B.5.6.2. weiter ausgeführt, zeigen alle Acetyltransferase-Banden aus der Fokussierung einheitliches Verhalten und trennen sich in die gleichen beiden Untereinheiten auf. Außer Verunreinigung durch andere, nicht abgetrennte multiple Formen der Acetyltransferase war somit keine weitere Kontamination der jeweiligen Enzympräparation anzunehmen.

Tabelle 4: Reinigung der AcetylCoA: 17-O-Deacetylindolin-Acetyltransferase

Reinigungsschritt	Gesamt- volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (nkat)	Spez. Aktivität (nkat/mg)	Ausbeute %	Reinigung (fach)
1 Rohextrakt	2300	6394	336	0,052	100	--
2 Protaminsulfat-Fällung	2360	5688	381	0,067	113	1,3
3 Ammoniumsulfat-Fällung	104	1425	376	0,263	112	5
4 Farbstoff-Chromatographie	60	81,6	242	3,22	72	581
5 Affinitäts-Chromatographie	80	3,55	194	54,6	58	1050
Hydrophobe Chromatographie	8	2,78	185	66,5	55	1278
Isoelektrische Fokussierung:						
Bande 1	0,3	0,126	22,9	181,7		3490
Bande 2	0,3	0,108	9,9	92,0		1770
Bande 3	0,3	0,132	18,1	137,0	insgesamt 16	2635
Bande 4	0,3	0,078	0,9	12,6		252
Bande 5	0,3	0,102	2,6	25,5		510

14.200
20.100
24.000
29.000
36.000
45.000
66.000

- 159 -

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Abb. 44: SDS-Elektropherogramm von Fraktionen während der Reinigung

1: Rohextrakt; 2: ProtaminSO₄; 3: (NH₄)₂SO₄; 4: Phenyl-Säule;
5: CoA-Säule; 6-10 IEF-Banden 1-5; 11 IEF-Bande 1+5; 12 Marker

Die höchste spezifische Aktivität, die für eine der multiplen Acetyltransferase-Formen bestimmt werden konnte, betrug ca. 182 nkat/mg Protein. Unter der Annahme eines aktiven Zentrums pro Enzym mit MW 44.000 Dalton errechnet sich danach eine Wechselzahl von 500/min als Untergrenze.

5.5 Charakterisierung der Acetyltransferase

Die Eigenschaften der Acetyltransferase wurden ohne Auftrennung der multiplen Formen durch isoelektrische Fokussierung ermittelt. Zum Einsatz kam ein Gelfiltrat, das von der Enzympräparation aus der hydrophoben Chromatographie erhalten wurde.

5.5.1. pH-Abhängigkeit der Acetyltransferase-Reaktion

Der Einfluß verschiedener pH-Werte auf die enzymkatalysierte Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin wurde mit Inkubationen in verschiedenen Puffern ermittelt. Dazu dienten 0,1 M Tris-Phosphat (pH 5-9,2) und 0,1 M Glycin/NaOH (pH 9-10), die jeweils bei der Inkubationstemperatur von 30 °C eingestellt wurden. Daneben bestanden die Reaktionsansätze aus 3,2 pkat Acetyltransferase (100 nkat/mg Protein), 30 nmol ^3H -AcetylCoA (155 Bq/nmol) und 10 nmol 17-O-Deacetylvindolin in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml. Nach 15 Minuten Reaktionsdauer gab man jedem Ansatz 300 μl 1 M Boratpuffer pH 8,6 zu. Dadurch wurden für das nachfolgende Ausschütteln mit 0,5 ml Ethylacetat die pH-Werte vereinheitlicht. Die Auswertung der Radioaktivität in 350 μl Essigester ergab die in Abbildung 45 dargestellte Beziehung. Es wird deutlich, daß die Aktivität der Acetyltransferase nur eine geringe Abhängigkeit vom pH-Wert ihrer Umgebung zeigt. Der breite Bereich, in dem eine Acetylierung meßbar ist, besitzt ein leichtes Maximum bei pH 8,3, während bei pH 6,5 und 10,0 noch die Hälfte der Enzymaktivität vorhanden ist.

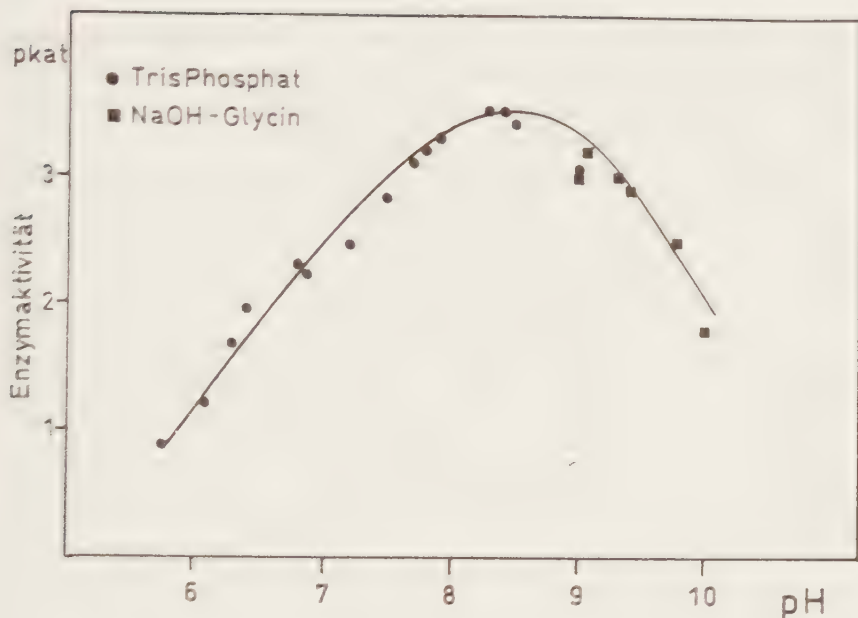


Abb. 45: pH-Abhängigkeit der Transferase-Reaktion

5.5.2. Molekulargewichtsbestimmung der Acetyltransferase

Zwei voneinander unabhängige Methoden wurden zur Ermittlung des Molekulargewichts der Acetyltransferase herangezogen.

Zur Bestimmung durch Gelfiltration (ANDREWS, 1964, 1965) wurde eine LKB TSK G 3000 SW Säule der Abmessung 300 x 8 mm mit einer Flußrate von 170 µl/Minute bei 2 bar Gegendruck betrieben. Die mobile Phase bestand aus 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5 mit 100 mM Kaliumchlorid. Um die Elutionsgeschwindigkeit als Maß für den Radius des als globulär gedachten Proteins verwenden zu können, wurde die Säule mit den folgenden Proteinen kalibriert: Cytochrom c (MW 12.500), Chymotrypsin (MW 25.000), Ei-Albumin (MW 45.000), Rinder-Albumin (MW 66.000), Aldolase (MW 158.000), Katalase (MW 246.000) und Ferritin (MW 450.000). 400 µg Protein aus der hydrophoben Chromatographie (III.B.5.4.4.) in 200 µl Volumen wurden unter diesen Bedingungen chromatographiert. Abb. 46

läßt Eichgerade und Elutionsvolumen der Transferaseaktivität erkennen. Diese wurde zu 100 nkat/mg Protein bestimmt. Als Molekulargewicht der Acetyltransferase ergab sich 44.000 Dalton ($\pm 10\%$).

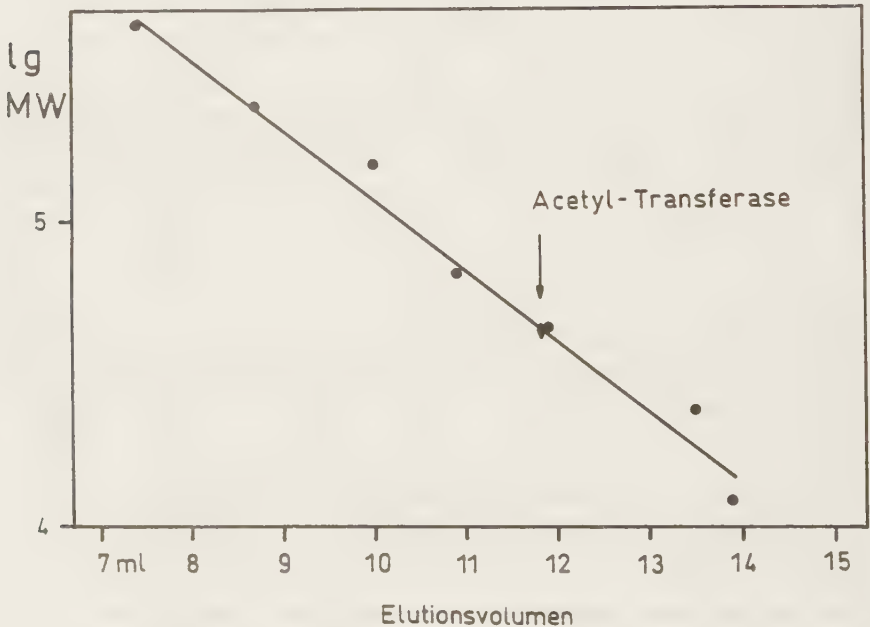


Abb. 46: Molekulargewichtsbestimmung der Acetyltransferase durch Gelfiltration

Die ebenso verbreitete Bestimmung des Molekulargewichts durch SDS-Elektrophorese (WEBER und OSBORN, 1969; LAEMMLI, 1970) setzt schon eine Reinigung voraus, da das Beladen des Proteins mit Dodecylsulfat zum Verlust der biologischen Aktivität führt. Eine Renaturierung eines solchermaßen behandelten Enzyms stellt die glückliche Ausnahme dar. Ansonsten ist eine Anfärbung des im Gel fixierten Proteins die Detektionsmethode. Zur Orientierung hinsichtlich der Laufstrecke wurden Markerproteine mit SDS beladen und mit aufgetragen. Dieses Gemisch bestand aus α -Lactalbumin (MW 14.200), Trypsininhibitor aus Soja (MW 20.100), PMSF-Trypsinogen (MW

24.000), Carboanhydrase (MW 29.000), Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (MW 36.000), Ei-Albumin MW 45.000) und Rinder-Albumin (MW 66.000). Aus der präparativen Fokussierung (III.B.5.4.5.) erhaltene Acetyltransferase-Fraktionen wurden der SDS-Diskelektrophorese, wie in II.B.5.2. ausgeführt, unterworfen. Nach Silberfärbung (II.B.5.3.) zeigte das Elektropherogramm (Abbildung 44, III.B.5.4.5.) für diese Proben ein jeweils identisches Bandenmuster aus zwei Untereinheiten (III.B.5.6.2.). Diese Banden lagen genau auf Höhe der Markerproteine mit MW 20.100 und 29.000.

Zur Interpretation dieser Daten wurde mit denselben Enzymfraktionen eine Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt, wie sie unter II.B.5.1. beschrieben wird. Als Anhaltspunkt für eine mit vom Molekulargewicht abhängige Wanderstrecke diente die Auftrennung der bei der Gelchromatographie benutzten Eichproteine. Nach Färbung (II.B.5.1.) ergab jede der Acetyltransferase-Proben nur eine einzige Bande. Aus nicht fixierten Gelbahnen, die in Streifen zu 3 mm Höhe fraktioniert abgetragen wurden, ließ sich die Enzymaktivität genau auf der Laufhöhe dieser Proteinbanden detektieren. Abbildung 47 zeigt die Wanderung der Eichproteine relativ zur gesamten Trennstrecke aufgetragen, sowie die gemittelte Lage der Acetyltransferase-Banden in diesem Bezugssystem. Errechnen läßt sich demnach ein Molekulargewicht von ca. 49.000. Da noch die Ladungsdichte das Laufverhalten des nativen Proteins mitbestimmt, gelingt eine exakte Ermittlung eines Molekulargewichts erst durch Wiederholung der Elektrophorese in Gelen verschiedener Porosität (FERGUSON, 1964). Dennoch war dieser Wert in guter Näherung von der Acetyltransferase zu erwarten, wenn sie aus den beiden Untereinheiten der SDS-Elektrophorese (MW ca. 20.000 und 29.000) bestehen sollte. Zudem lag auch bei einem nativen Porengradientengel (analog III.B.5.2.) die Transferase-Bande knapp hinter dem Ei-Albumin (MW 45.000) zurück.

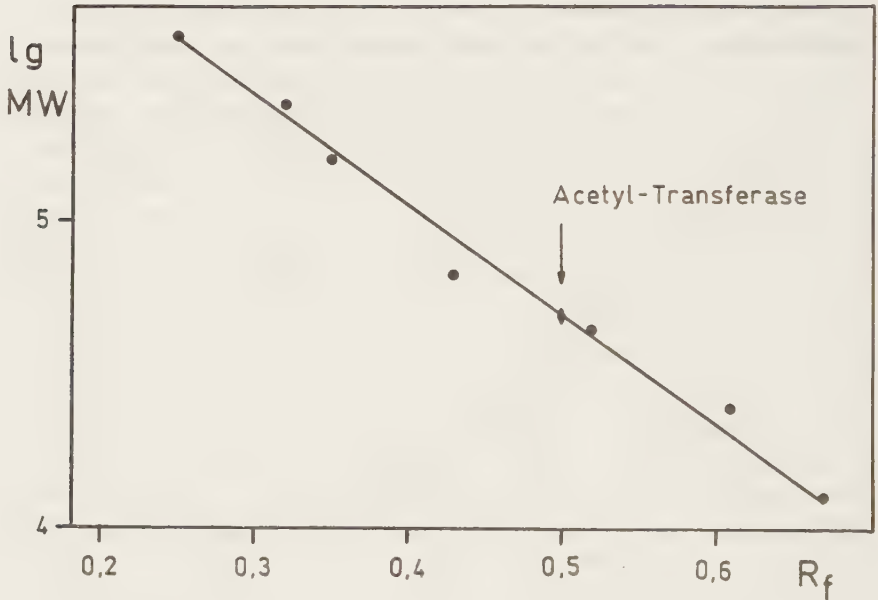


Abb. 47. Molekulargewichtsbestimmung der Acetyltransferase durch Gelelektrophorese

5.5.3. Bestimmung von isoelektrischen Punkten der Acetyltransferase-Formen

Eingesetzt wurden jene Banden, die aus der präparativen isoelektrischen Fokussierung (III.B.5.4.5.) erhalten worden waren. Da mit dieser Methode keine zuverlässige pI-Bestimmung möglich war, wurde nochmals eine analytische Fokussierung im Polyacrylamid-Gel ausgeführt. Dabei kamen auch Proteine mit bekannten isoelektrischen Punkten zur Auftrennung. Im verwendeten Trennbereich sichtbar waren Ferritin (pI 4,4), Rinderserumalbumin (pI 4,7) und β -Lactoglobulin (pI 5,34). Zum Vergleich erfolgte eine Trägerampholyt-Fokussierung (II.B.5.4) mit Gradient pH 4-6 sowie eine Immobiline-Fokussierung (II.B.5.5.) im Bereich pH 4-7. Bei letzterer zeigten sich deutlich getrennte, scharfe einzelne Proteinbanden. Eine bloße Aggregatbildung der Proteine mit Trägerampholyten war somit ausgeschlossen. Bei der Fokussierung mit Ampholyten waren

dagegen noch kleinere Nebenbanden sichtbar. Durch den flacheren Gradienten konnte hier auch eine weitergehende Mikroheterogenität zum Tragen kommen. Folgende pI-Werte wurden ermittelt:

Bande präp. IEF	pI Trägerampholyte	pI Immobiline
5,4	5,2	5,0
4,9	5,0	4,9
4,6	4,9	4,8
4,4	4,8	4,7
4,3	4,6	4,6

Diese Werte lassen sich mit der Charakterisierung der Acetyltransferase durch DELUCA et al. (1985) vereinbaren; bei Chromatofokussierung mit linearem pH-Gradienten von pH 5,8 bis 4,2 wurde von diesen Autoren ein Aktivitätsmaximum zwischen pI 4,4 und 4,8 verzeichnet.

5.5.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Acetyltransferase

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Acetyl-Coenzym A ließ sich durch variierende Konzentrationen von AcetylCoA bei Sättigung mit 17-O-Deacetylvindolin bestimmen; ^3H -AcetylCoA in je 2, 5, 7,5, 10, 20, 40 und 50 μM Konzentration mit je 1,85 kBq Gesamtradioaktivität wurde mit 25 nmol 17-O-Deacetylvindolin, und 2,5 pkat Acetyltransferase (100 nkat/mg Protein, stabilisiert mit 50 μg BSA) in 0,5 ml Volumen inkubiert.

Zwei parallele Testreihen unterschieden sich nur durch den Puffer, einmal 0,1 M Kaliumphosphat, in der anderen Serie 0,1 M Hepes-Na, beide mit pH 8,0. Nach 10 Minuten bei 30 °C wurden die Ansätze mit 0,7 ml Essigester extrahiert und nach Zentrifugation 350 μl der organischen Phase abgenommen. Diesen Extrakt trug man nach Abziehen des Essigesters zusammen mit je 5 μg Vindolin auf eine Dünnschichtplatte auf.

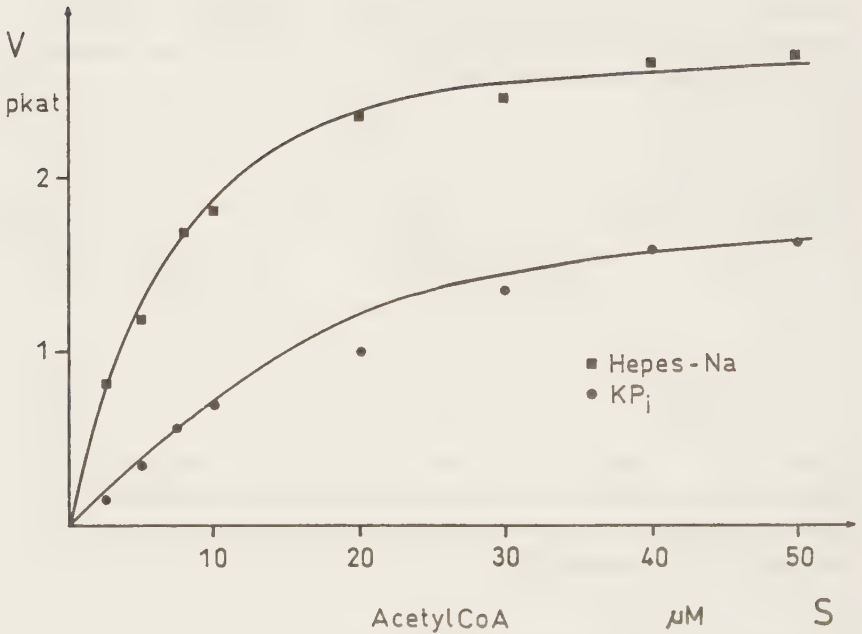


Abb. 48: Michaelis/Menten-Darstellung der Acetyltransferase-Reaktion in Abhängigkeit von AcetylCoA

Nach Entwicklung im Laufmittel A wurden die Vindolin-Zonen im UV detektiert. Das Kieselgel ließ sich in einem Glasröhrchen von der Platte abtragen und mit Methanol eluieren. Das ausgewaschene radioaktive Vindolin wurde mit Szintillations-Zählung bestimmt. Abbildung 48 besteht aus der Michaelis/Menten-Darstellung der Abhängigkeit der Acetyltransferase-Reaktion von Acetyl-Coenzym A. Für Hepes- und Kaliumphosphat-Puffer ergeben sich unterschiedliche AcetylCoA-Sättigungs-Kurven.

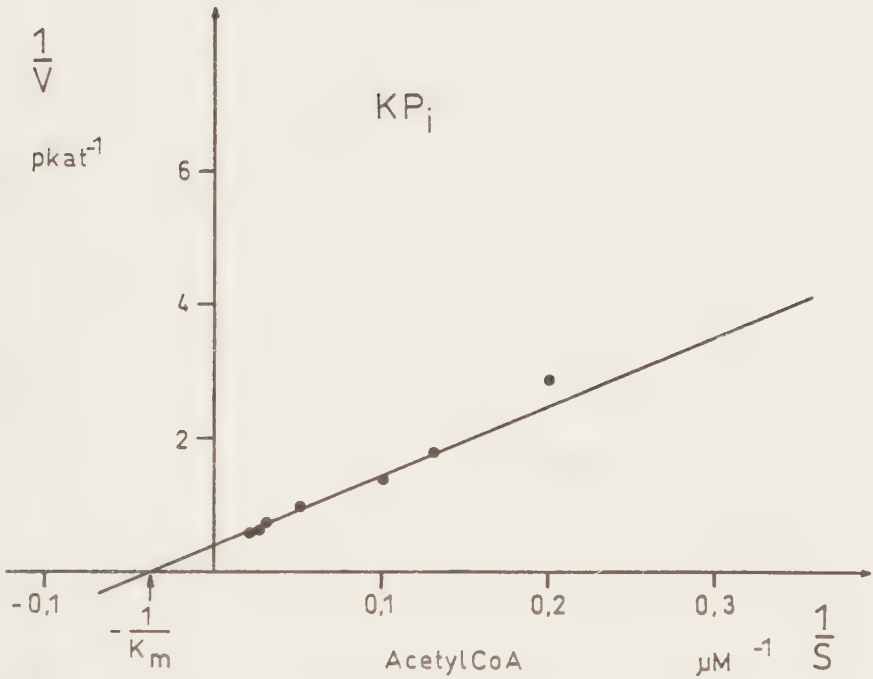


Abb. 49a: Lineweaver/Burk-Diagramm der AcetylCoA-Abhängigkeit der Transferase-Reaktion in KP_i -Puffer

Für die Inkubationen im Kaliumphosphat-Puffer errechnete sich aus der Auftragung nach LINEWEAVER und BURK (1934) wie in Abbildung 49a eine Michaelis-Konstante von $25 \mu\text{M}$ bei einer maximalen Geschwindigkeit von $2,5 \text{ pkat}$; im Hepes-Puffer lag der K_m -Wert bei $5 \mu\text{M}$ und die V_{max} bei $2,8 \text{ pkat}$ (Abbildung 49b).

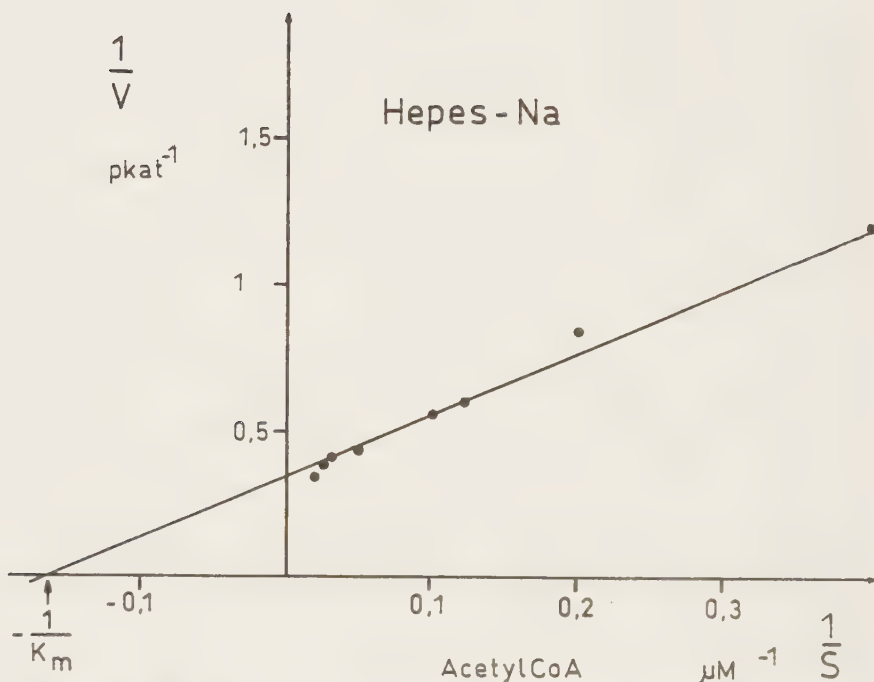


Abb. 49b: Lineweaver/Burk-Diagramm der AcetylCoA-Abhängigkeit der Transferase-Reaktion in Hepes-Puffer

Der Einfluß der Konzentration an 17-O-Deacetylvindolin auf die enzymatische Reaktion wurde bei AcetylCoA-Sättigung untersucht. Alkaloid zu 0,5 bis 10 μM Konzentration in je 20 μl Methanol gelöst wurde zusammen mit 30 nmol ^3H -AcetylCoA (spez. Aktivität 155 Bq/nmol), 100 μg BSA und 1,3 pkat Acetyltransferase (100 pkat/mg Protein) in 1 ml Hepes-Na (0,1 M, pH 8,0) für 10 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Nach Extraktion mit 0,7 ml Essigester wurde der Test genauso wie für die Bestimmung der AcetylCoA-Abhängigkeit ausgewertet.

Die Abbildung 50 zeigt die Auftragungen nach Michaelis/Menten und Eisenthal/Cornish-Bowden (AHLERS et al., 1982). Es ergab sich ein K_m -Wert von 0,6 μM bei einer Maximalgeschwindigkeit von 1,3 pkat.

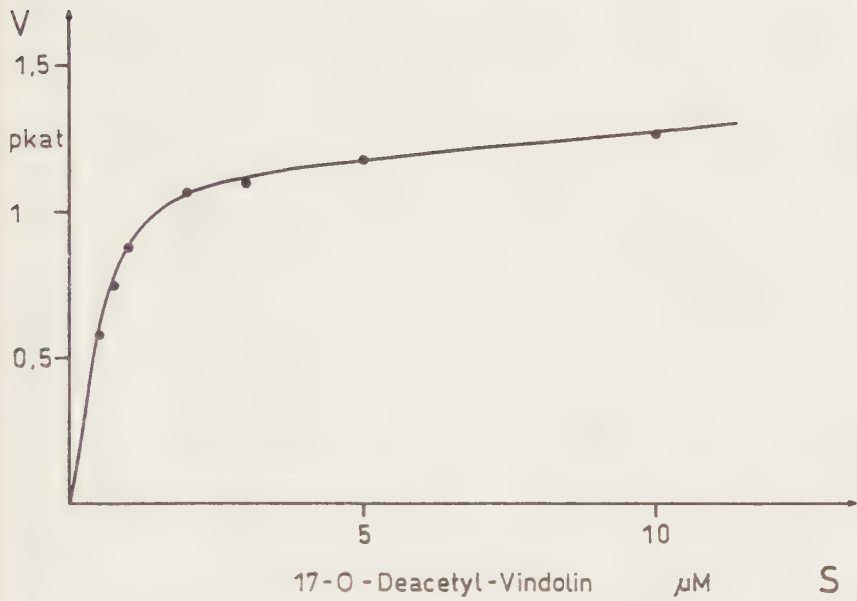


Abb. 50a: Michaelis/Menten-Darstellung der Abhängigkeit der Acetyltransferase-Reaktion von 17-O-Deacetylvindolin

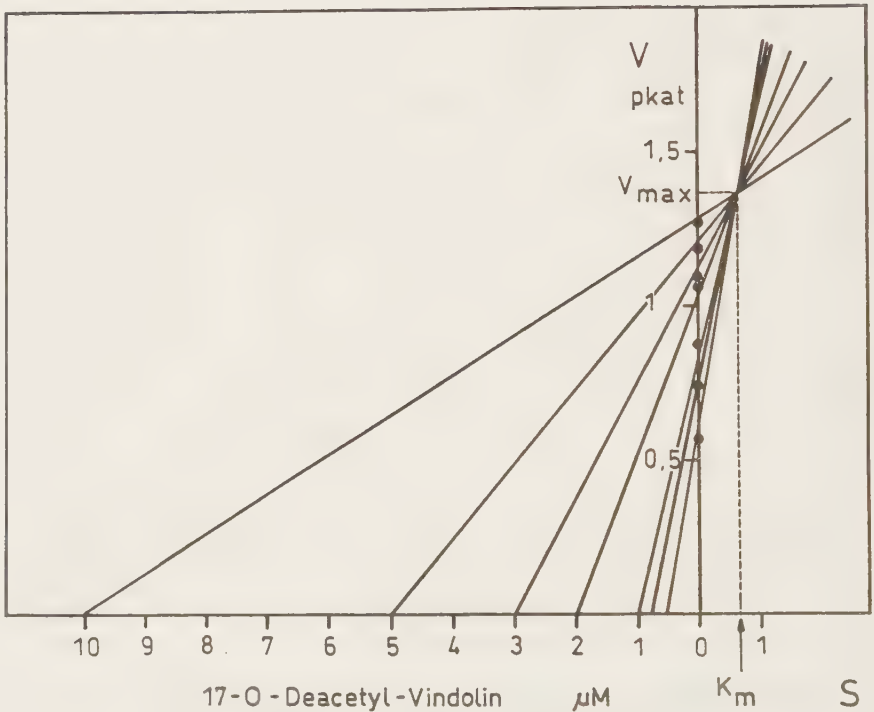


Abb. 50b: Eisenthal/Cornish-Bowden-Darstellung der 17-O-Deacetyl-Vindolin-Abhängigkeit

5.5.5. Substratspezifität der Acetyltransferase

Unter den Gesichtspunkten der Zugehörigkeit zur Biosynthese-sequenz wie auch der Reihenfolge dieser einzelnen Reaktionsschritte war die Substratspezifität der Acetyltransferase von besonderem Interesse. Eine bezüglich möglicher Alkaloid-Substrate breit angelegte Untersuchung umfaßte die in II.B.1.3.u.4. und II.B.3.3. erhaltenen Deacetylderivate. Darüber hinaus konnten 17-Hydroxy-Tabersonin sowie verschiedenartige weitere Indolalkaloide mit freier, chemisch acetylierbarer (II.B.1.1.) Hydroxylgruppe eingesetzt werden.

Inkubiert wurden in 0,2 ml 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 je 25 nmol zu acetylierendes Alkaloid und 30 nmol ^3H -AcetylCoA (1,55 kBq/nmol) mit 4,5 pkat Acetyltransferase (1,2 nkat/mg

Protein). Nach 15 Minuten bei 30 °C extrahierte man die Reaktionsmischung mit 0,5 ml Ethylacetat. Von der organischen Phase wurden 350 µl abgenommen, je 50 µg der jeweils korrespondierenden acetylierten Verbindung zugegeben und das Lösungsmittel abgezogen. Folgende Laufmittel wurden zur Auftrennung des resultierend Rückstands auf Kieselgel-Dünnschichtplatten benutzt: Laufmittel A: Deacetylvinblastin/Vinblastin R_f 0,2/0,3; Deacetylvincristin/Vincristin R_f 0,1/0,2; 17-Hydroxy-Tabersonin/17-Acetoxy-Tabersonin R_f 0,5/0,7; Vindolin/16-O-Acetylvindolin R_f 0,4/0,6; Vindorosin/16-O-Acetylvindorosin R_f 0,4/0,6; Ajmalin/17-O-Acetyljajmalin R_f 0,3/0,6.

Laufmittel D: 17-O-Deacetylvindolin/Vindolin R_f 0,6/0,7; 17-O-Deacetylvindorosin/Vindorosin R_f 0,5/0,7; Yohimbin/Acetylyohimbin R_f 0,5/0,8.

Laufmittel E: 17-O-Deacetyl-N_α-Demethylvindolin/N_α-Demethylvindolin R_f 0,4/0,6; 17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin/11-O-Demethylvindolin R_f 0,3/0,5; 17-O-Deacetyl-N_α-Demethylvindorosin/N_α-Demethylvindorosin R_f 0,4/0,6.

Laufmittel F: 17-O-Deacetylvindolinsäure/Vindolinsäure R_f 0,4/0,5.

Nach Detektion im UV bei 254 nm wurden die entsprechenden Kieselgel-Zonen mit Methanol eluiert. Die Reaktionsraten ließen sich durch die Radioaktivität der gebildeten Acetylverbindungen miteinander vergleichen. In Tabelle 5 sind diese auf Vindolin (100%) bezogen aufgelistet.

Demnach ist die Deacetylvindolin-Acetyltransferase ein hochspezifisches Enzym. Unter den nicht umgesetzten Substraten befanden sich neben 17-Hydroxy-Tabersonin auch die Deacetyl-Derivate von Vinblastin und Vincristin, die Hinweise auf den Zeitpunkt der Acetylierung in der Biosynthesesequenz gaben.

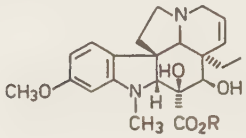
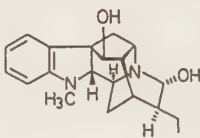
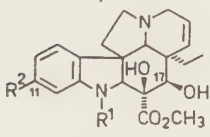
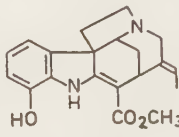
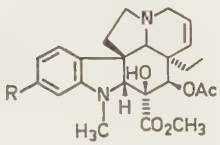
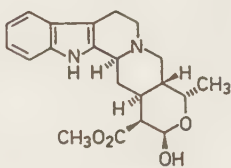
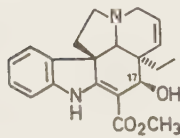
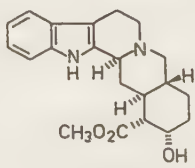
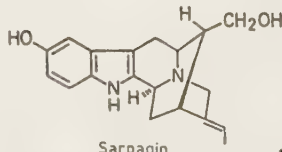
Substrat	rel. Enzymaktivität %	Substrat	rel. Enzymaktivität %
 Deacetylvindolin (R=CH₃) Deacetylvindolinsäure (R=H)	100 4	 Ajmatin	< 0.01
 N_a-Demethyldeacetylvindolin (R¹=H, R²=OCH₃) Deacetylvindorosin (R¹=CH₃, R²=H) N_a-Demethyldeacetylvindorosin (R¹=R²=H) 11-O-Demethylvindolin (R¹=CH₃, R²=OH)	95 65 36 25	 Vinervin	< 0.01
 Vindolin (R=OCH₃) Vindorosin (R=H)	< 0.01 < 0.01	 Ajmaticin	< 0.01
 17-OH-Tabersonin Deacetylvindblastin Deacetylvincristin	< 0.01 < 0.01 < 0.01	 Yohimbine	< 0.01
		 Sarpagine	< 0.01

Tabelle 5: Substratspezifität der Acetyltransferase

Auch wurden Vindolin und Vindorosin nicht weiter zu den 16-O-Acetylverbindungen umgesetzt, die auch keine natürlich vorkommenden Alkaloide darstellen.

Zur weiteren Charakterisierung der Transferase wurden bei den enzymatisch acetylierten Substraten die K_m -Werte bestimmt. Variierende Alkaloidmengen von 0,175, 0,25, 0,35, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4 und 6 nmol wurden in Gegenwart von 30 nmol ^3H -Acetyl CoA mit entsprechend der Alkaloidkonzentration veränderten spezifischen Aktivität von 1,2 kBq/nmol bis 155 Bq/nmol getestet. Weiterhin bestanden die Inkubationen aus 0,1 bis 0,6 pkat Acetyltransferase (100 nkat/mg Protein), stabilisiert mit 100 μg BSA in insgesamt 1 ml Hepes-Na Puffer (0,1 M, pH 8,0), und dauerten bei 30 °C 10 Minuten. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 0,7 ml Essigester ausgeschüttelt und 350 μl der organischen Phase mit je 5 μg der entsprechenden Acetylverbindung versetzt und eingeeengt. Dünnschichtchromatographie und weitere Aufarbeitung erfolgten wie oben angegeben. Aus je zwei Einzelmessungen zweier unabhängiger Meßreihen wurden Mittelwerte der nach Eisenthal und Cornish-Bowden (AHLERS et al., 1982) graphisch bestimmten K_m -Werte gebildet:

Substrat	K_m (μM)	$v_{rel.}$ (%)
17-O-Deacetylvindolin	$0,65 \pm 0,1$	100
17-O-Deacetylvindorosin	$0,25 \pm 0,05$	60 ± 10
17-O-Deacetyl-11-O-demethylvindolin	$0,9 \pm 0,3$	70 ± 15
17-O-Deacetyl-N α -Demethylvindolin	$0,7 \pm 0,4$	100 ± 50
17-O-Deacetyl-N α -Demethylvindorosin	$0,25 \pm 0,05$	70 ± 40

Somit waren sehr niedrige Alkaloidkonzentrationen zum Erreichen der halben maximalen Umsatzgeschwindigkeit nötig. Diese waren innerhalb einer Größenordnung bei den eingesetzten Substraten gleich.

Nach der Spezifität der Transferase für zu acetylierende Alkaloide war noch die Spezifität bezüglich des umgesetzten Cosubstrats abzuklären. Dazu inkubierte man n-PropionylCoA in Konzentrationen von 6, 12, 30 und 50 μM zusammen mit je 5, 12 und 20 μM ^3H -AcetylCoA der spezifischen Radioaktivität von 740, 615 oder 370 Bq/nmol. Für 10 Minuten wurden diese Cosubstrate von 0,5 pkat Acetyltransferase (20 nkat/mg Protein, stabilisiert mit 100 μg BSA) in Gegenwart von 25 nmol 17-O-Deacetylvindolin in 0,5 ml Hepes-Na-Puffer 0,1 M pH 8,0 bei 30 °C umgesetzt. Zum Beenden der Reaktion extrahierte man die Testansätze mit 0,7 ml Essigester und arbeitete die organische Phase wie oben beschrieben auf. Gemessen wurde so die von PropionylCoA gehemmte Acetylierung zu Vindolin.

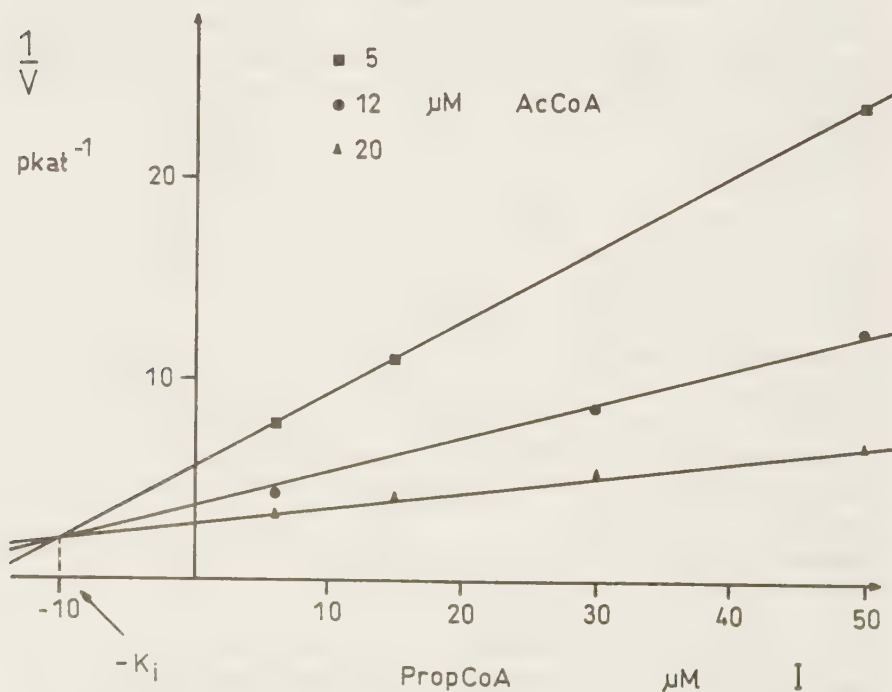


Abb. 51: Dixon-Darstellung der Hemmung der Acetyltransferase-Reaktion durch PropionylCoA

Unmittelbar über der Vindolinzone im Laufmittel A zeigte sich in deutlicher Abhängigkeit von der PropionylCoA-Konzentration auf der Dünnschichtplatte eine weitere Fluoreszenzlöschung. Diese Zone ergab nach Elution des Vindolin mit CAS-Reagenz besprüht eine einer acylierten Verbindung entsprechende violette Färbung.

Aus der graphischen Auswertung nach Dixon (AHLERS et al., 1982) in Abbildung 51, die das typische Bild einer kompetitiven Hemmung der AcetylCoA-abhängigen Reaktion durch PropionylCoA zeigt, wird ein K_i -Wert von 10 μ M ersichtlich. Dieser Wert beschreibt die Affinität des ebenfalls umgesetzten PropionylCoA zum Enzym in Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle wie für das zum Bezug eingesetzte AcetylCoA.

Also ist er auch als K_m -Wert für PropionylCoA zu interpretieren und damit im verwendeten Puffer doppelt so hoch als die Michaelis-Konstante von AcetylCoA.

5.5.6. Abklärung der CoA-abhängigen Rückreaktion der Acetyltransferase

Im Zuge der Untersuchungen zur Substratspezifität der Transferase war auch Vindolin eingesetzt worden. Dabei wurde Vindolin in Anwesenheit von ^{3} H-AcetylCoA zwar nicht an der 16-Hydroxygruppe acetyliert, jedoch selbst, unter Austausch der Acetylgruppe, radioaktiv markiert. Diese Beobachtung war durch eine Umkehrung der 17-O-Acetyltransferase-Reaktion zu erklären (Abb. 52).

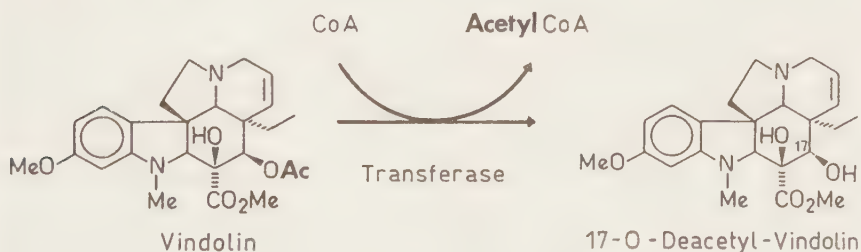


Abb. 52: CoA-abhängige Rückreaktion der Acetyltransferase

Um eine Bedeutung von freiem Coenzym A für diese Reaktion zu belegen, wurde dieses vor der Zugabe von Vindolin zur Inkubation durch Umsetzung mit AcetylCoA-Synthetase aus dem Enzymansatz weitgehend entfernt. Zunächst ließ man 2 nmol ^3H -AcetylCoA (23,6 kBq/nmol) mit 1 μmol Natriumacetat, 450 nmol ATP, 1,7 μmol MgCl_2 , und 11 nkat AcetylCoA-Synthetase in 180 μl 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 für 10 Minuten bei 30 °C vorinkubieren. Dann wurden 25 nmol Vindolin und 42 pkat (1,2 nkat/mg Protein) Acetyltransferase im selben Puffer auf ein Gesamtvolumen von 0,4 ml zugefügt. Ein Kontrollansatz war bis auf das Fehlen der AcetylCoA-Synthetase identisch, freies CoA noch vorhanden. Auswertung der Ansätze wie in III.B.5.5.5. erläutert ergab eine Verminderung des Acetylgruppen-Austausches im Vindolin um 75% gegenüber der Kontrolle.

Da es sich also um eine Rückreaktion der Acetyltransferase und nicht um das Zusammenspiel einer Esterase (III.B.5.3.3.) mit der Transferase handelte, wurden zum Vergleich Vindolin und Vinblastin angeboten. Dabei sollte die gleiche Substratspezifität wie bei der Hinreaktion zu ermitteln sein. Je 25 nmol Alkaloid und 2 nmol ^3H -AcetylCoA (27,8 kBq/nmol) inkubierten mit 100 pkat Transferase (1,2 nkat/mg Protein) in 0,2 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer. Nach 45 Minuten bei einer Temperatur von 30 °C extrahierte man die Ansätze mit Essigester. Bei der Auswertung wie bei III.B.5.5.5. waren aus der Vinblastin-Zone 55 cpm, aus dem Vindolin 324.000 cpm zu messen. Damit war nochmals die Substratspezifität der 17-O-Acetyltransferase gezeigt.

Weitere Aufschlüsse über die Natur des beobachteten Acetylgruppen-Austausches ließen sich durch Untersuchung der CoA-Abhängigkeit gewinnen.

^{14}C -Acetyl-markiertes Vindolin (0,5 nmol, 2,22 kBq/nmol; siehe II.B.1.5.) wurde mit 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 und 200 nmol CoA und 7 pkat Acetyltransferase (1,2 nkat/mg Protein) in 0,2 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 eine Stunde auf 30 °C temperiert. Nach der folgenden Extraktion mit 0,5 ml

Essigester wurde die Abnahme der Radioaktivität in der organischen Phase durch Deacetylierung von Vindolin gemessen.

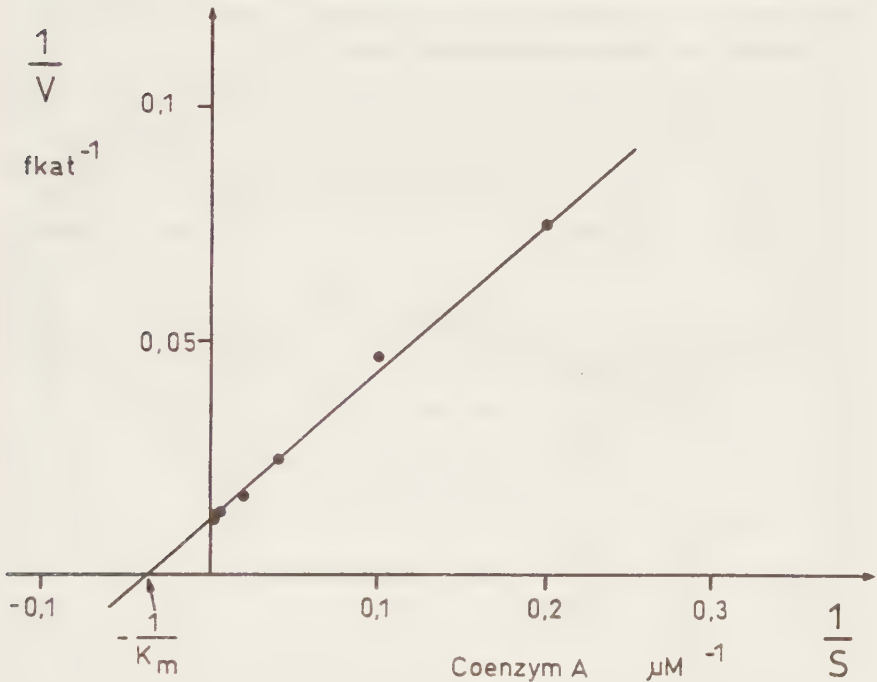


Abb. 53: Lineweaver/Burk-Diagramm der Rückreaktion in Abhängigkeit von Coenzym A

Diese Werte konnte man als Maß für die Bildung von ^{14}C -AcetylCoA nehmen, das nicht mit ausgeschüttelt wurde. Die Abbildung 53 demonstriert die CoA-Abhängigkeit der Deacetylierung. Der Lineweaver/Burk-Darstellung läßt sich ein K_m -Wert von 25 μM entnehmen. Dieser entspricht in Kaliumphosphat-Puffer der Michaelis-Konstanten von AcetylCoA für die Hinreaktion.

5.5.7. Untersuchungen zum Mechanismus der Acetyltransferase

Enzymkatalysierte Reaktionen, bei denen zwei Substrate umgesetzt werden, werfen die Frage auf, in welcher Reihenfolge beide Substrate an das Enzym gebunden werden. Möglich sind

dabei eine zufällige, eine geordnete Abfolge oder ein ping/pong-Mechanismus. Unterscheidungen lassen sich durch kinetische Untersuchungen treffen, die auftretende Produkthemmungen charakterisieren (AHLERS *et al.*, 1982).

Eine Hemmung der Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin durch Vindolin konnte nicht festgestellt werden. Nur durch Coenzym A war eine Produkthemmung zu beobachten. Zur Unterscheidung verschiedener Hemmtypen mußte je ein Substrat in konstanter, das andere in zusammen mit Inhibitor variierender Konzentration eingesetzt werden.

Zunächst wurden bei Sättigung mit 17-O-Deacetylvindolin die Mengen von AcetylCoA und CoA im Ansatz verändert. In 0,5 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 mit je 2, 3, 4, 7,5, 15, 20, 30, 35 und 40 nmol CoA gab man je 3 (450 Bq/nmol), 15 oder 30 nmol (je 155 Bq/nmol ^3H -AcetylCoA).

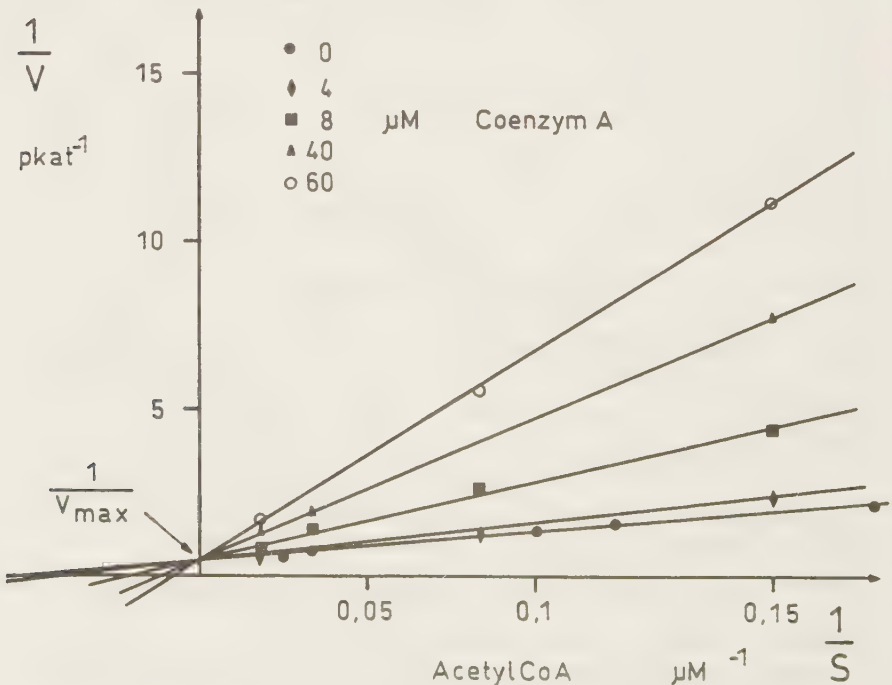


Abb. 54: Lineweaver/Burk-Diagramm der Hemmung der Transferase-Reaktion durch Coenzym A kompetitiv mit AcetylCoA

Diese Lösungen wurden mit 25 nmol 17-O-Deacetylvindolin, 50 µg BSA und 2 pkat Transferase (100 nkat/mg) 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Extraktion der Enzymtests mit 0,5 ml Ethylacetat bestimmte man die Radioaktivität in 350 µl der organischen Phase. Parallel dazu wurden Inkubationen ohne CoA mit 2, 5, 7,5, 10, 20, 30 und 40 µM ³H-AcetylCoA mit 1,85 kBq Gesamtaktivität und 50 µM 17-O-Deacetylvindolin unter denselben Bedingungen ausgewertet.

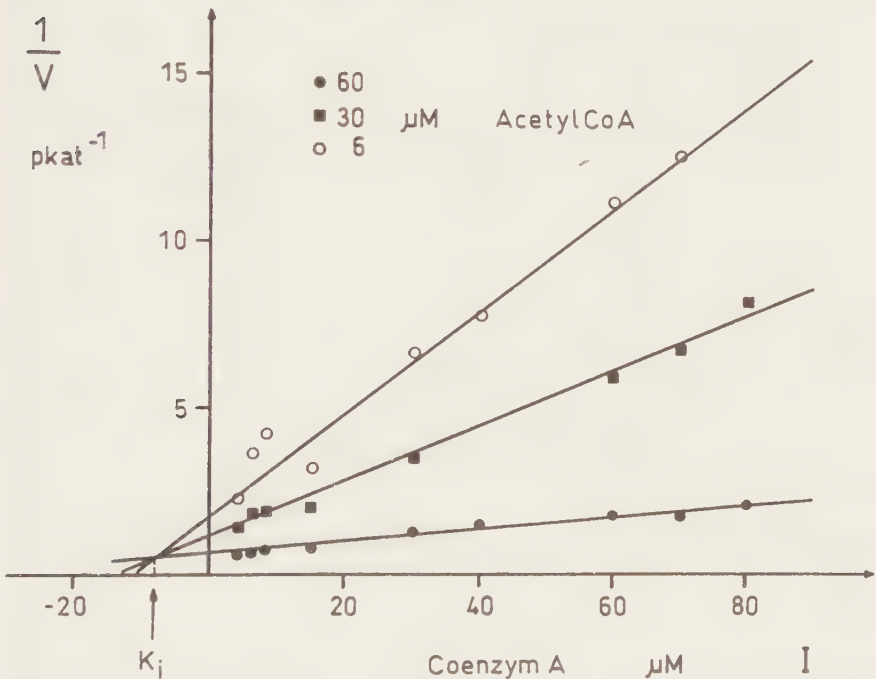


Abb. 55: Dixon-Darstellung der Hemmung der Transferase-Reaktion durch Coenzym A kompetitiv mit AcetylCoA

Die Lineweaver/Burk-Auftragung in Abbildung 54 zeigt das Vorliegen einer kompetitiven Hemmung. Der Dixon-Darstellung in Abbildung 55 entnimmt man einen K_i -Wert von 8 μM . In HEPES-Puffer war die gleiche Inhibitor-Konstante für Coenzym A zu ermitteln.

Ergänzend dazu wurde die Enzymkinetik bei gleichbleibender AcetylCoA-Konzentration und verschiedenen Mengen an Coenzym A und 17-O-Deacetylvindolin betrachtet. Mit je 0,75, 1, 2, und 4 μM 17-O-Deacetylvindolin ließen sich 0, 6, und 30 nmol ^3H -AcetylCoA (155 Bq/nmol) in Gegenwart von 1 pkat Transferase (100 nkat/mg Protein) und 100 μg BSA in 1 ml 100 mM Kaliumphosphat pH 8,0 inkubieren.

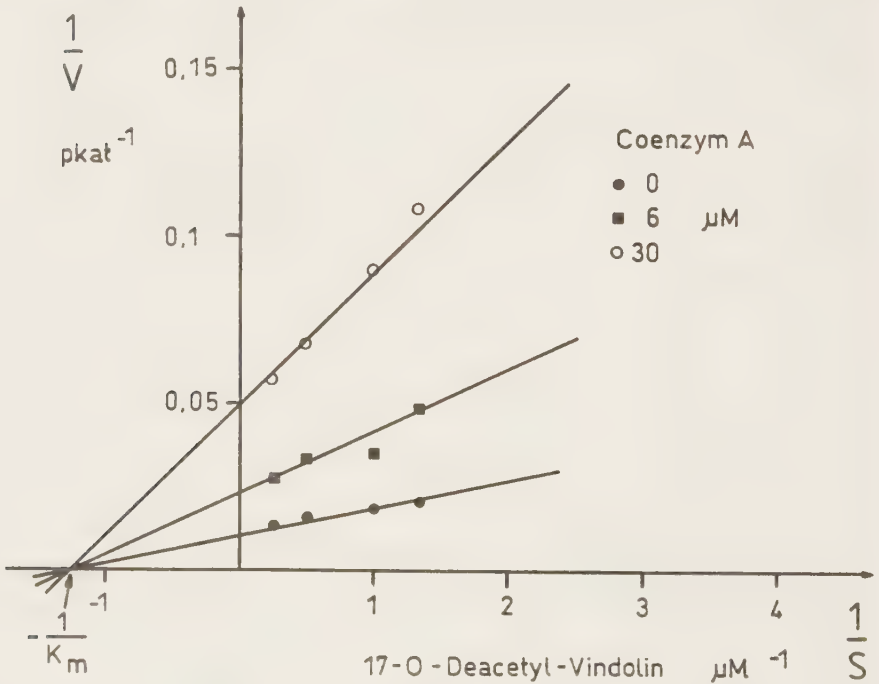


Abb. 56: Lineweaver/Burk-Diagramm der Hemmung der Transferase-Reaktion durch CoA nichtkompetitiv mit 17-O-Deacetylvindolin

Nach 10 Minuten bei 30 °C wurde gegen Essigester ausgeschüttelt und in einem Aliquot der organischen Phase die enthaltene Radioaktivität bestimmt. Die Auswertung dieser Messung nach Lineweaver/Burk in Abbildung 56 läßt sich nur mit einer nichtkompetitiven Hemmung in Einklang bringen; in der graphischen Auftragung nach Dixon (Abbildung 57) wird ein K_i -Wert von 8 μM apparent.

Coenzym A zeigt also gegenüber dem Leitsubstrat AcetylCoA eine kompetitive, gegenüber 17-O-Deacetylvindolin eine nichtkompetitive Hemmung. Dabei wird die Affinität zum Inhibitor nicht durch Bindung von 17-O-Deacetylvindolin herabgesetzt. Plausibel ist damit ein geordneter Mechanismus (AHLERS *et al.*, 1982), bei dem zuerst AcetylCoA und danach 17-O-Deacetylvindolin an das Enzym gebunden werden.

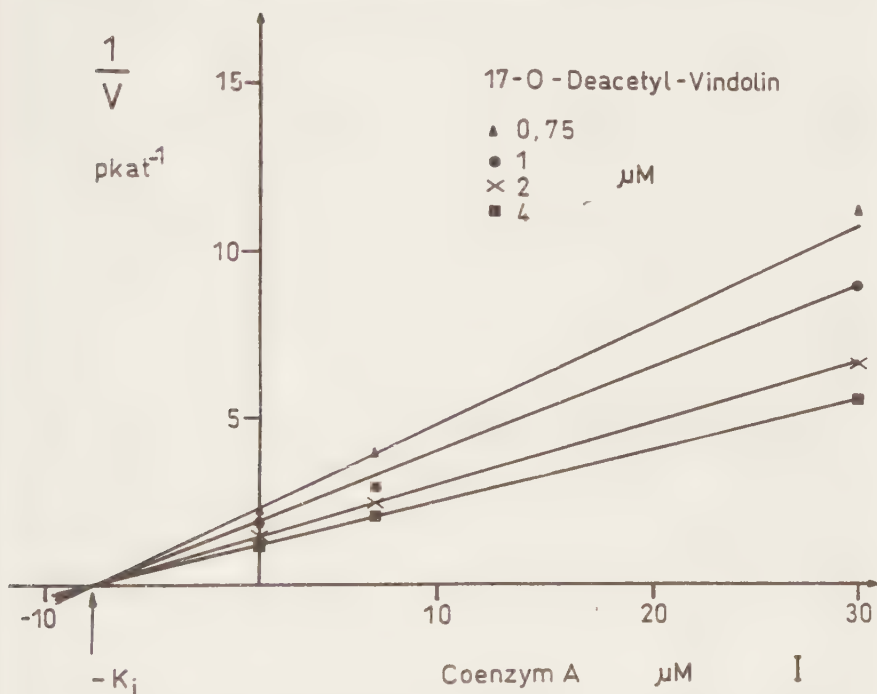


Abb. 57: Dixon-Darstellung der Hemmung der Transferase-Reaktion durch CoA nichtkompetitiv mit 17-O-Deacetylvindolin

5.5.8. Hemmstoffversuche zur Acetyltransferase-Reaktion

Durch Auswahl geeigneter Hemmstoffe lassen sich Enzyme weiter charakterisieren. Dabei werden für die katalytische Funktion wichtige Strukturelemente und Effektoren aufgeheilt.

Metallionen und Inhibitoren kamen in den Konzentrationen der Tabelle 6 zum Einsatz. In je 0,5 ml 100 mM Kaliumphosphat-

Puffer pH 8,0 wurden sie zusammen mit 30 nmol ^3H -AcetylCoA (155 Bq/nmol), 50 μg BSA und 2 pkat Transferase (100 nkat/mg Protein) 5 Minuten bei 30 °C vorinkubiert. Nach der Zugabe von 10 nmol 17-O-Deacetylvindolin führte man die Reaktion 10 Minuten so weiter. Die Ansätze wurden nach Extraktion mit Essigester auf Radioaktivität in der organischen Phase geprüft und mit Kontrollen ohne Hemmstoff und ohne Alkaloid verglichen. Die Ergebnisse sind wieder in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Hemmstoffversuche zur enzymatischen Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin

Inhibitor	Hemmung %
N-Ethylmaleimid 0,25 mM	90
5,5'-Dithiobisbenzoat 50 μM	80
Iodacetamid 25 mM	70
Iodosobenzoat 0,5 mM	65
NaN_3 40 mM	30
EDTA 10 mM	10
H_2O_2 0,3 mM	10
Phenylmethylsulfonylfluorid 1 mM	5
Acetylaceton 0,2 mM	0
KCN 20 mM	0
Hg^{++} 1 mM	100
Cu^{++} 0,5 mM	95
Zn^{++} 5 mM	70
Ni^{++} 5 mM	60
Cs^+ 1 mM	50
Co^{++} 5 mM	40
Sn^{++} 5 mM	25
Li^+ 0,5 mM	10
Fe^{+++} 5 mM	15
Ca^{++} 5 mM	0
Mg^{++} 5 mM	0

Für die Acetyltransferase ist demnach eine signifikante Hemmung durch typische Sulfhydrylgruppen-Inhibitoren (BOYER, 1959) zu erkennen. Dieses Verhalten korreliert mit einer

Stabilisierung der Transferase-Aktivität durch Oxidationsschutz.

5.5.9. Regulation der Acetyltransferase

Als weiteres Merkmal einer Biosynthesesequenz ist eine Hemmung von Enzymen vorhergehender Reaktionsschritte durch das Endprodukt möglich. Eine Beeinflussung der Acetyltransferase-Aktivität durch Vindolin war nicht feststellbar.

5.6. Untersuchungen der Multiplizität der Acetyltransferase

Unter den Bedingungen der präparativen isoelektrischen Fokussierung wurden fünf Aktivitäts-Maxima der enzymatischen Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin bei unterschiedlichen pI-Werten detektiert und durch analytische Fokussierung und SDS-Gelelektrophorese weiter charakterisiert (III.B.5.5.2. und III.B.5.5.3.). Im Folgendem sollten mögliche Ursachen für diese Auftrennung der Transferase-Aktivität abgeklärt werden.

5.6.1. Kontrollversuche zum Ausschluß von Isolierungsartefakten

Als Störfaktoren sind bei der präparativen Fokussierung Aggregation des Proteins mit Trägerampholyten und Oxidation an der großen Geloberfläche denkbar. Sie konnten durch den angewandten Oxidationsschutz (5 mM DTE) und vergleichbare Auftrennung im Immobiline Gel (III.B.5.3.3.) ausgeschlossen werden.

Gelfiltration nach verschiedenen Schritten des Reinigungsganges in unterschiedlichen Chromatographie-Medien (Fraktogel TSK HW 50 S, 55 S, 65 S; AcA 54; LKB TSK G 3000 SW) und Puffern (Kaliumphosphat pH 6,5-8,0; Imidazol-HCl pH 6,8; Tris-HCl pH 7,5; pH-Werte bei RT) zeigte symmetrische Elution der Enzymaktivität. Dabei bestätigte sich regelmäßig ein Molekulargewicht von etwa 44.000 Dalton. Ebenso sprach das Verhalten der Acetyltransferase bei Ionenaustausch-Chromatographie an DE 52, Fraktogel TSK HW DEAE 650 S und Mono Q (Pharmacia) in Kaliumphosphat- oder Tris-HCl-Puffer gegen eine Aggregation mit anderen Proteinen. Durch linear ansteigende Kaliumchlorid-Gradienten wurde jeweils ein

einziges Aktivitätsmaximum erhalten. Allerdings war der Bereich, in dem das Enzym eluiert wurde, im Falle der schwachen DEAE-Austauscher wesentlich breiter als bei Chromatographie an einer Mono Q-Säule.

Weiterhin abzuklären war eine Modifikation des Enzyms durch pflanze-eigene Proteasen aufgrund der Dekompartimentierung während des Aufschlusses. Hierzu fand ein Gemisch von Proteaseinhibitoren Anwendung. Zu 100 g frisch eingefrorenen *Catharanthus roseus* Blättern wurden nach Vermahlen 50 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) gegeben. Dieser Puffer enthielt 1 mM EDTA, 100 µg Leupeptin und 1,7 mg in 200 µl Aceton angelöstes Phenylmethylsulfonylfluorid. Wie unter III.B.5.4.1. beschrieben, fanden eine Protaminsulfat- und, nach Zugabe von β -Mercaptoethanol (20 mM), eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung statt. Den zweiten Ammoniumsulfat-Niederschlag nahm man in 50 mM Tris-HCl-Puffer, 1 mM EDTA, 2 mM DTE, und 2 µg/l Leupeptin auf. Über eine Fraktogel TSK HW 40 F Säule wurde die Proteinlösung in 2 mM DTE überführt und mit dieser salzfreien Präparation das granuliert Gel zur Fokussierung (II.B.5.4.) gegossen. Der Fokussierung mit 12.000 Voltstunden schloß sich ein Celluloseacetat-Abdruck des Geles an. Nun konnte das Gel in Streifen von 5 mm Breite zur Laufrichtung abgetragen und jede Fraktion mit 0,5 ml Wasser umgeschüttelt werden. Der Test auf Acetyltransferase-Aktivität erfolgte mit je 5 µl Überstand dieser Fraktionen. Sie wurden mit 6 nmol ^3H -AcetylCoA (155 Bq/nmol), 10 nmol 17-O-Deacetyl-vindolin und 20 µg BSA in 0,1 ml Hepes-Na (0,1 M, pH 8,0) für 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Abbildung 58 demonstriert die resultierende Aktivitätsverteilung. Obwohl eine Zuordnung zu den Maxima der präparativen Fokussierung nur zufriedenstellend gelingt, ist das Auftreten zumindest verschiedener aktiver Banden im Gel offensichtlich. Da verschiedene Acetyltransferase-Formen auch in Gegenwart von Protease-Inhibitoren erhalten werden, ist eine proteolytische Modifikation nicht die Voraussetzung für dieses Verhalten des Enzyms.

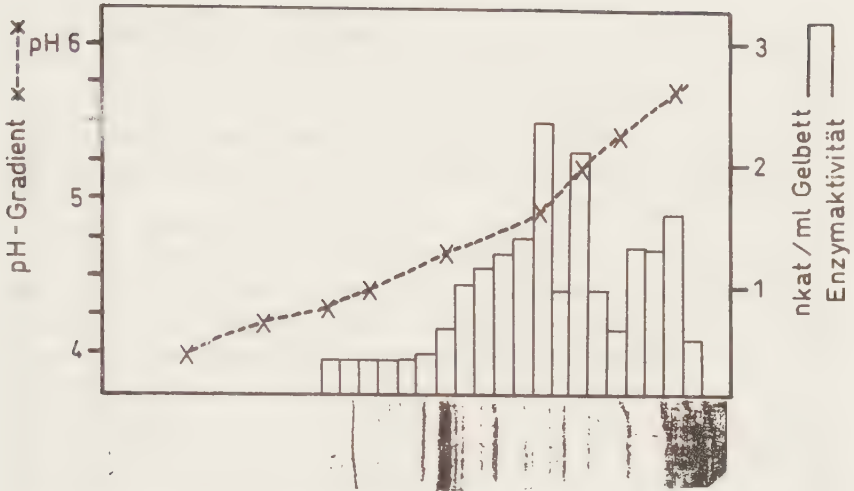


Abb. 58: IEF der Acetyltransferase unter Protease-Schutz

5.6.2. Auftrennung der Acetyltransferase in zwei Untereinheiten

In der nativen Gelelektrophorese von Fokussierungs-Fraktionen war jeweils nur eine Bande anfärbbar, die auch die Enzymaktivität repräsentierte (III.B.5.5.2.). Dagegen ließen sich nach Silberfärbung der SDS-Elektrophorese jeweils zwei Banden erkennen, deren Molekulargewichts-Summe in etwa den durch native Elektrophorese und Gelfiltration ermittelten Werten entsprach (III.B.5.2.2.). Diese Auftrennung in zwei Banden trat bei allen aktiven Fraktionen der Fokussierung einheitlich auf. Um eine Aufspaltung des Enzyms allein durch die Hitzebehandlung auszuschließen, belud man die Proben nur bei Raumtemperatur mit Dodecylsulfat. Dieses Vorgehen führte wieder zum gleichen Bandenmuster. Ebenso erhielt man diese Auftrennung in zwei verschieden große Teile bei SDS-Denaturierung in Abwesenheit des Reduktionsmittels Dithioerythrit. Somit war dazu auch keine Aufspaltung von Disulfid-Brücken notwendig.

Nach diesen Ergebnissen aus der SDS-Elektrophorese entsprechen die beiden Banden zwei lose assoziierten Untereinheiten der Acetyltransferase.

5.6.3. Verhalten der Acetyltransferase bei der isoelektrischen Fokussierung

Da nur mit dieser Methode die Multiplizität der Acetyltransferase festgestellt wurde, war dem Laufverhalten der Enzymaktivität enthaltenden Proteinbanden besonderes Augenmerk zu schenken.

Laufunterschiede durch bloße Bildung verschiedener Konformere konnten nach Vorinkubation von Fraktionen der Fokussierung (III.B.5.4.5.) bei 37 °C über eine Stunde nicht bemerkt werden. Erneute Fokussierung zeigte gegenüber den bei 0 °C gelagerten Proben unveränderte Bandenmuster in der analytischen Fokussierung (II.B.5.4.). Ebenso wurde eine Phosphorylierung untersucht. Je 5 µg Acetyltransferase inkubierten mit 30 nkat (bezogen auf p-Nitrophenylphosphat) alkalischer Phosphatase. Nach 20 Minuten bei 30 °C in Tris/Glycin-Puffer pH 8,5, 1 mM ZnCl₂ und 1 mM MgCl₂ zeigten die so behandelten Fraktionen keine Unterschiede in ihrer Fokussierung zu Kontrollansätzen ohne oder mit denaturierter Phosphatase. Auch eine Modifikation durch Phosphorylierung konnte also nicht nachgewiesen werden.

5.6.4. Vorliegen einer N-terminalen Modifikation

Für die Fragestellung, welche Ursache der Multiplizität der Acetyltransferase zugrunde liegt, war eine Information über die Aminosäuresequenz besonders wertvoll. Gerade sollte dabei der Vergleich der jeweils gleich großen Untereinheiten Aufschlüsse geben können.

Mit der von HEWICH *et al.* (1981) vorgestellten Ansequenzierung von Polypeptiden in der Gasphase steht eine Methode zur Verfügung, die sich schon mit Protein-Mengen im Picomol-Bereich begnügt. Für die nochmalige SDS-Elektrophorese und versuchte Ansequenzierung von Acetyltransferase-Fraktionen danke ich den Mitarbeitern von Herrn Dr. Lottspeich (MPI Martinsried).

Dazu wurden die beiden in ihrem pI unterschiedlichsten multiplen Enzymformen in je ca. 100 µg Ausbeute aus insgesamt 16 kg im Herbst geernteten *C. roseus* Blättern erhalten. Es

mußte dabei in vier Arbeitsgängen à 4 kg wie in III.B.5.4. beschrieben verfahren werden. Die aus den je zwei Unter-einheiten resultierenden 4 Polypeptide erwiesen sich sämtlich als N-terminal blockiert.

5.7. Versuche zur Kompartimentierung der Acetyltransferase

Acetyltransferase-Aktivität fand sich lediglich in der löslichen Proteinfraction, und nicht an Partikel gebunden. Da das Vorkommen des Enzyms nur auf photosynthetisch aktive Pflanzenteile beschränkt ist (III.B.5.3.1.), war auch eine Lokalisierung in den Chloroplasten in Erwägung zu ziehen.

Nach LEEGOOD und WALKER (1983) wurden aus *C. roseus* Blättern Chloroplasten isoliert und anschließend auf Acetyltransferase-Aktivität getestet. Weder in Präparationen mit intakten noch mit lysierten Chloroplasten konnte diese Enzymtätigkeit detektiert werden.

IV. Diskussion

Die Abfolge einzelner Reaktionen in der Biosynthese eines Naturstoffes läßt sich durch mehrere Methoden in Erfahrung bringen. So kann man beobachten, ob als Vorstufen gedachte Verbindungen nach Applikation an die Pflanze in das Endprodukt des Syntheseweges eingebaut werden. Dabei sollten Intermediate, die diesem Produkt biogenetisch näher stehen, höhere Einbauraten erzielen können. Weiterhin ist die Möglichkeit gegeben, solche Zwischenprodukte aus dem Pflanzenmaterial zu isolieren. Die schrittweise Änderung auf das Endprodukt hin ist besonders elegant bei einer sequentiellen Isolierung solcher Vorläufer aus Keimlingen nachzuvollziehen (QURESHI und SCOTT, 1968; DELUCA *et al.*, 1986). Auf der nächsten Ebene sind Untersuchungen zur Substratspezifität von an der Biosynthese beteiligten Enzymen anzusiedeln. Schließlich können Kompartimentierung und entwicklungsphysiologische Regulation der Enzyme wie der Intermediate Erkenntnisse über die Synthesesequenz bringen (DELUCA *et al.*, 1986; 1988).

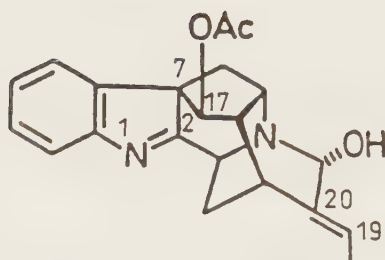
Besonders vorteilhaft als Ausgangsmaterial für solche enzymatischen Arbeiten haben sich pflanzliche Zellkulturen erwiesen. Unter definierten Laborbedingungen ist es möglich, ganzjährig die benötigten Gewebemengen verfügbar zu halten. Der Primärstoffwechsel von heterotrophen Zellkulturen vereinfacht sich gegenüber der photoautotrophen Pflanze. Verringerte Mengen an phenolischen Inhaltsstoffen sowie einfachere mechanische Manipulation schaffen die günstigen Voraussetzungen, um auch labile Enzymaktivitäten und Stoffwechselintermediate zu detektieren. Beispiele für die erfolgreiche Verwendung dieser Gewebekulturen zur Erforschung von Biosynthese-Vorgängen sind die Bildung der Flavonoide (HAHLBROCK und GRISEBACH, 1975), der Isochinolin-Alkaloide (ZENK, 1985) sowie der Ajmalin-/Sarpagin-Weg in *Rauwolfia serpentina* (A.PFITZNER, 1984).

Gerade bei der schwer zu kultivierenden und langsam wachsenden *R. serpentina* war die Zellkultur-Technik Wegbereiter für tiefere Einblicke in die Biosynthese dieser Wurzel-Alkaloide. Da die Abfolge dieser Reaktionen im wesentlichen bereits geklärt ist (A.PFITZNER, 1984), sollte noch ein Beitrag zur Bestimmung des abschließenden Schrittes der Ajmalin-Bildung geleistet werden.

Nach dem von A.PFITZNER postulierten Weg erfolgt der Schlußteil dieser Sequenz über das Intermediat Vomilenin durch Reduktions-, Entacetylierungs- und Methylierungs- Schritte zum Ajmalin (Schema 18). Dabei stellt die 17-O-Acetyleinheit des Vomilenin eine Schutzgruppe zum Erhalt des Ajmalan-Skeletts dar. Diese kann erst nach Reduktion der 1,2-Bindung ohne Ringöffnung zwischen C-17 und C-7 abgespalten werden.

Das Enzym, das sowohl Ringschluß als auch Acetylierung bewerkstelligt, die Vinorin-Synthase, nimmt N-methylierte Substrate nicht an; die N-Methylierung muß also später erfolgen (A.PFITZNER, 1984). Dazu ist wiederum Reduktion der 1,2-Doppelbindung erforderlich; die 17-O-Acetylgruppe wird dadurch aber entbehrlich. Da sowohl Norajmalin als auch Acetylnorajmalin wie Ajmalin und Acetyljmalin aus der *R. serpentina* Zellkultur zu isolieren sind, läßt sich so keine eindeutige Abfolge herleiten. Jedenfalls ist die schon von COURT (1983) aufgrund seiner Alkaloid-Isolierungen aus Wurzeln verschiedenster Rauwolfia-Arten vermutete Abfolge Sarpagan-Norajmalan- Ajmalan-Gerüst gültig.

Die 17-O-Acetylgruppe wird von einer Esterase-Aktivität entfernt (A.PFITZNER, 1984). Die genaue Charakterisierung dieses hochspezifischen Enzyms (POLZ et al., 1987) ergab für Acetylnorajmalin eine leichte Bevorzugung als Substrat ($K_m = 22 \mu\text{Mol}$) gegenüber Acetyljmalin ($K_m = 27 \mu\text{Mol}$). Das Verhalten der S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen N-Methyltransferase, wiederum bereits 1984 von A.PFITZNER beschrieben, sollte ein weiteres Kriterium ergeben, um den Weg zu Ajmalin abzustecken.



Vomilenin

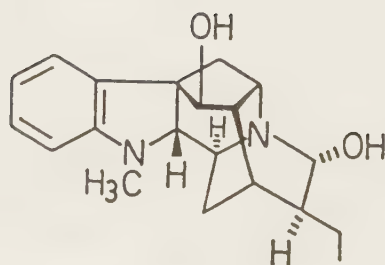


1,2-19,20-Reduktion



17-Deacetylierung

N-Methylierung



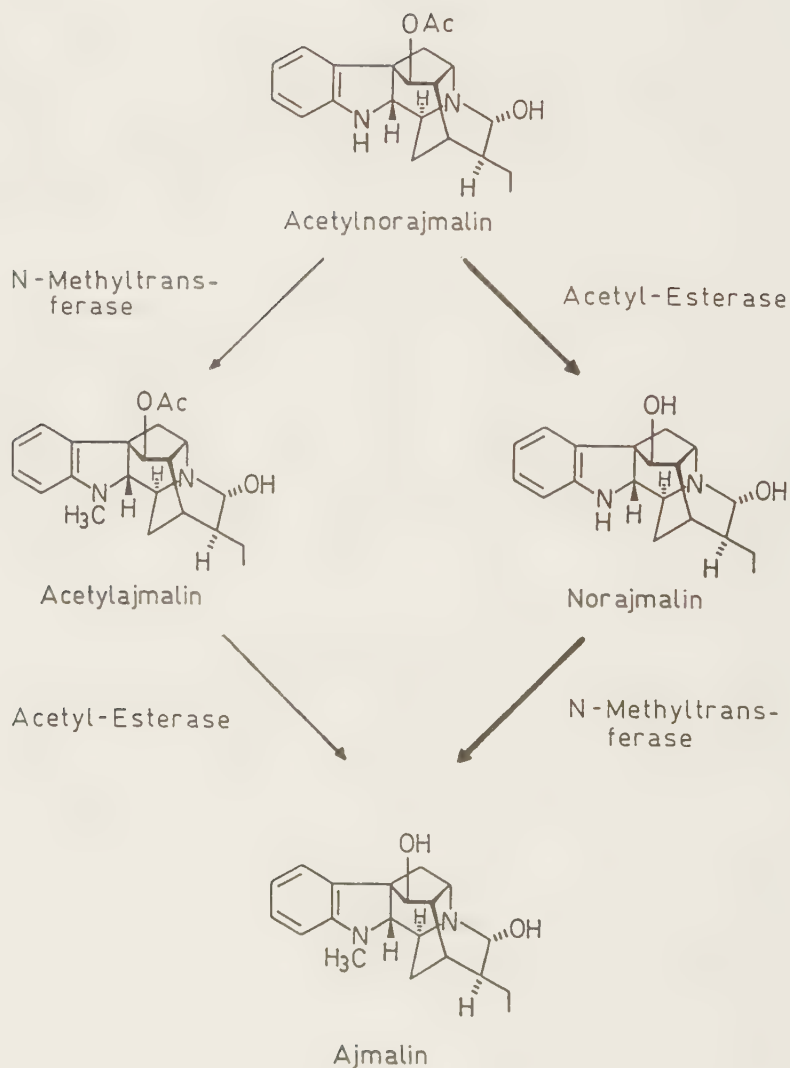
Ajmalin

Schema 18: Bildung von Ajmalin aus Vomilenin

Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Enzymen dieser Biosynthese-Sequenz handelt es sich bei dieser Methyltransferase um ein Membran-assoziiertes Enzym. Nachdem dies durch Gelfiltration und geglückte Solubilisierung abgesichert war, konnte zumindest ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten mit Acetylnorajmalin und Norajmalin

als Substraten erreicht werden. Demnach wird wiederum Norajmalin (100%) besser umgesetzt als Acetylnorajmalin (40% rel. Geschwindigkeit). Zusammen mit den Daten für die Acetyltransferase (POLZ et al., 1987), ist eine leichte Bevorzugung der Sequenz Acetylnorajmalin, Norajmalin, Ajmalin gegenüber dem Weg mit dem Intermediat Acetylajmalin zu erkennen (Schema 19). Aus letzterem wurde über mikrobielle Demethylierung das Acetylnorajmalin erstmals synthetisch zugänglich gemacht.

Bei einigen anderen Alkaloid-Biosynthesen, wie beispielsweise die des Nicotin (MITZUSAKI et al., 1971), des Morphin (WAT et al., 1986), des Rutacridon (BAUMERT und Mitarb., 1983) und des Vindolin (DELUCA und andere, 1987), erfolgt eine N-Methylierung in einem frühen Stadium der Sequenz. Im Gegensatz dazu kann also beim Ajmalin-Weg eine abschließende N-Methylierung stattfinden. Die Ausnahmestellung der Methyltransferase als offensichtlich besonders kompartimentiertes Protein unterstützt diese Sichtweise. Jedoch müssen auch noch andere mögliche Substrate als Norajmalin und dessen acetylierte Form für die Methyltransferase in Betracht gezogen werden. So wurde von BARTON und Mitarb. (1965) nicht nur die Herkunft der N-Methylgruppe aus Methionin gezeigt, sondern auch ein Einbau von 21-Deoxyajmalin ins Ajmalin nach Fütterung an *R. verticillata* verzeichnet. Wie schon von A. PFITZNER (1984) gefordert, sind in diesem Zusammenhang nicht nur die Substratspezifität der 21-Hydroxylase, sondern auch die Akzeptanz der Methyltransferase für 21-Deoxy-Verbindungen abzuklären. Für weitergehende Untersuchungen der N-Methyltransferase sind nun wesentliche Vorarbeiten geleistet worden.



Schema 19: Bevorzugte Reihenfolge der letzten Schritte der Ajmalin-Biosynthese

Während die Intermediate der Ajmalin-Biosynthese recht gut aus der Zellkultur von *R. serpentina* zu isolieren waren (STÖCKIGT et al., 1981), bestand mit *Catharanthus roseus* keine so günstige Situation. So war zwar der Abschnitt der Biosynthese zwischen Strictosidin und Tabersonin durch sequentielle Isolierung von Intermediaten skizziert (QURESHI und SCOTT, 1968), in Richtung Vindolin verlor sich jedoch nach Methoxytabersonin die Spur. Und obwohl sowohl Pflanze mit über 90 (RAHMAN et al., 1984a) und Zellkulturen von *C. roseus* mit ca. 40 isolierten Alkaloiden (KURZ et al., 1980; STÖCKIGT und SOLL, 1980; GUÉRITTE et al., 1983; KOHL et al., 1983; KUTNEY et al., 1983) zu den phytochemisch mit am besten charakterisierten Objekten gehören, waren keine unmittelbaren Vorläufer des Vindolin, Hauptalkaloid in den Blättern, bekannt. Um noch neue Alkaloide aufzufinden, wurde zuletzt Blattdroge im Maßstab von 22 kg benötigt (RAHMAN et al., 1985), und auch die Blüten untersucht (RAHMAN und Mitarb., 1984b). Mögliche Intermediate wurden jedoch auch so nicht mit identifiziert. Stellt man dabei in Rechnung, daß solche Sekundärstoffwechsel-Zwischenprodukte von Haus aus in geringen Mengen und niedriger stationärer Konzentration anfallen, wird dies auch verständlich. Trotzdem wurde der Versuch unternommen, in einem phytochemisch noch nicht bearbeiteten Pflanzenteil solche Intermediate nachzuweisen.

Beim direkten Vergleich der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung von Extrakten aus Blättern und Fruchtschalen von *C. roseus* im LM A fiel eine Alkaloidbande besonders auf. Diese war nur in dem Perikarp-Extrakt zu detektieren und mit sehr ähnlichem Laufverhalten und ebenfalls ähnlicher CAS-Färbung unmittelbar über dem Vindolin auszumachen. Aus 60 g Fruchtschale konnte von dieser Verbindung ca. 4 mg gewonnen werden. Obwohl eine vollständige Aufklärung dieser Struktur nicht gelang, ist eine Funktion als Vindolin-Vorläufer auszuschließen.

Mit dem Konzept, Intermediate des Vindolin-Stoffwechsels zu isolieren, war die Arbeitsgruppe um DELUCA erfolgreicher. Angeregt vom Vorgehen von QURESHI und SCOTT (1968) wurden dabei auch entwicklungsphysiologische Fragestellungen während der Samenkeimung angegangen (DELUCA et al., 1986). So konnte aus 1 kg im Dunkeln gezogener Keimlinge von BALSEVICH und Mitarb. (1986) 10 mg eines neuen Alkaloids isoliert werden. Dieses wurde als 17-Desacetoxy-Vindolin identifiziert und als unmittelbarer Vindolin-Vorläufer postuliert. Dieses Intermediat ermöglichte die weitgehende sequentielle Einordnung der späten Enzymaktivitäten bei der Vindolin-Biosynthese.

Der beste mit einem Fütterungsexperiment an *C. roseus* erzielte Einbau in Vindolin hatte der mit identischem Grundgerüst ausgestattete Vorläufer Tabersonin ergeben (4,8% Wiederfindungs-Rate; SCOTT, 1970). Als nun dieses Intermediat zellfrei mit *C. roseus* Proteinextrakt umgesetzt wurde, ließen sich keine Vorstufen des Vindolin, sondern Dimere und Trimere des Tabersonin auffinden.

Dabei war eine Oxidation des Tabersonin zur Iminium-Form ursächlich, die sowohl durch Inkubation mit Proteinextrakt als auch durch chemische Oxidation mit $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ gleichermaßen zu diesen Alkaloiden führte. Iminium-Tabersonin als Vorstufe von all diesen Folgeprodukten wurde indirekt als Nitril und als Acetonyl-Addukt nachgewiesen.

Die Addition von Acetonyleinheiten an Iminium-Formen von Alkaloiden ist nicht ungewöhnlich. So ist der Naturstoff Sanguidimerin aus zwei Sanguinarin-Einheiten zusammengesetzt, die über eine Acetonyl-Brücke verbunden sind (TIN-WA et al., 1972). Dieses Alkaloid läßt sich als das ebenfalls natürlich vorkommende Racemat, Chelidimerin, aus Sanguinarin und Acetondicarbonsäure darstellen. Dagegen führt die Oxidation von Berberinaceton nicht zu natürlich vorkommenden Derivaten (GOVINDACHARI et al., 1981). Hier ist das aus *Berberis aristata* isolierte Karachin zu nennen, das aus Berberin und

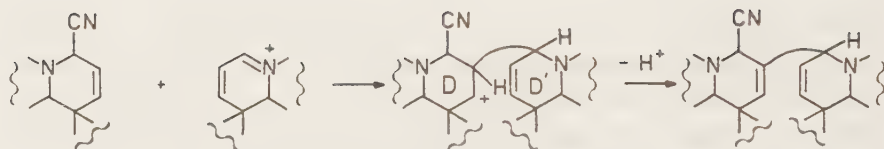
einer Ringstruktur aus ankondensierten Acetonyleinheiten besteht (BLASKO et al., 1982).

Gebräuchlicher zum Nachweis von Iminium-Alkaloiden ist allerdings das Abfangen als Nitril. Jedoch wurden solche Cyanide noch nicht als Naturstoffe reklamiert.

Additionsprodukte des so ausgemachten Iminium-Tabersonins mit sich selbst waren konzentrationsabhängig Carbinolamine oder tertiäre Amine. Die dabei ablaufenden Redox-Prozesse sind unklar.

Dimere Indolalkaloide, denen Tabersonin zugrunde liegt, sind recht selten aus pflanzlichem Material erhalten worden. Ein nicht näher definiertes Ditabersonin aus *Criocera dipladeniiflorus* (BRUNETON et al., 1973), das Voacinol, ein 14,14', jedoch über eine Methylengruppe verknüpftes Dimeres aus *Voacanga grandifolia* (GOVINDACHARI und Mitarb., 1987) und schließlich die direkt verknüpften Voafrine A und B (STÖCKIGT et al., 1983) aus *Voacanga africana* Zellkultur.

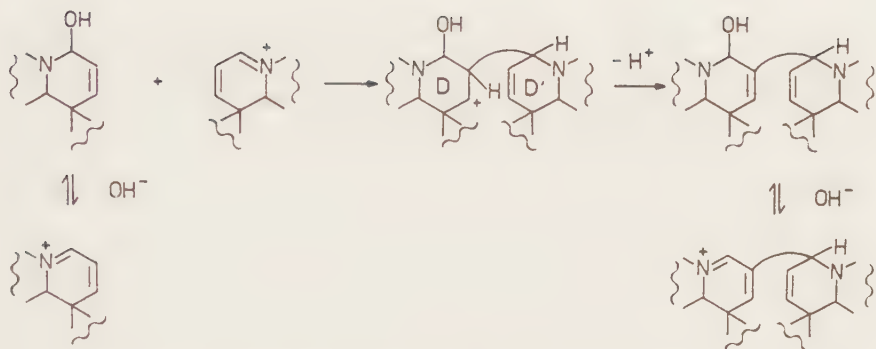
Die dimeren Reaktionsprodukte der enzymatischen wie der chemischen Tabersonin-Oxidation konnten eindeutig (UV, MS, NMR) als Voafrine A und B oder deren 3 α -Hydroxy-Derivate identifiziert werden. Um weiter zu untersuchen, wie diese Voafrin-typische 14,3'-Verknüpfung erfolgt, wurde Iminium-Tabersonin auf verschiedenen Wegen erzeugt. Mit einer photochemischen Reaktion konnte zwar eine Reihe neuer Verbrückungen zwischen den Tabersonyl-Einheiten aufgefunden, die Bildung von Voafrinen aber nicht nachgewiesen werden. Dagegen reagierte aus 3-Cyano-Tabersonin mit Silbercarbonat freigesetztes Iminium-Tabersonin mit weiterem Nitril zu Cyanodimeren, von denen eines als 3 α -Cyanovoafrin A zur Absicherung der 14,3'-Verknüpfung auch NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Zur Bildung dieses Dimeren ist eine Reaktion von Iminium-Tabersonin mit Cyanotabersonin denkbar (Schema 20).



Schema 20: Möglicher Weg von Cyano-Tabersonin zu Cyano-Voafirin. Es ist nur die an der Reaktion beteiligte Struktureinheit (Ring D) dargestellt

Auch die Verknüpfung eines anderen Bisindolalkaloids, Ervafofin (HENRIQUES *et al.*, 1978) konnte vergleichbar durch spontane Reaktion eines Iminium-Alkaloids nachvollzogen werden; auch hierbei war diese Iminiumform aus dem α -Nitril mit einem Silbersalz freigesetzt worden (HENRIQUES und Mitarb., 1981).

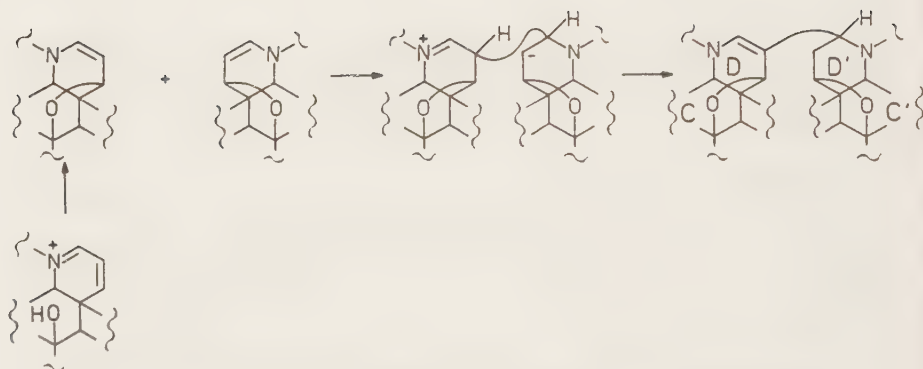
Erst nach Oxidation mit Quecksilber-II-acetat wurde genau dasselbe Spektrum an Reaktionsprodukten wie beim enzymatischen Ansatz beobachtet. So wurden diese Reaktionsabläufe modellhaft auch für die Enzymreaktion genauer untersucht. Primär lag dabei die Iminium-Form des Tabersonin vor, das erst in Kaliumphosphat-Puffer zu Tabersonin -Dimeren und -Trimeren weiterreagierte. Auch diese Reaktionsprodukte fielen dabei zunächst als Iminium-Salze an, was sich wie beim Iminium-Tabersonin durch Chromatographie vor und nach Reduktion mit Natriumborhydrid zeigen ließ. Vor der Reduktion konnte nur ein kleiner Teil der Kopplungsprodukte bei der Aufarbeitung als Carbinolamine erfaßt werden. Dies war für enzymatische wie chemische Oxidation durch beträchtlich erhöhte Ausbeuten aus den reduzierten Ansätzen gleichermaßen zu beobachten. Durch Zugabe von Tabersonin in Phosphat-Puffer mit bereits vollständig zur Iminium-Form oxidiertem Tabersonin ergab sich keine Vermehrung der Kopplungsprodukte; nicht oxidiertes Tabersonin nahm an dieser Reaktion nicht teil. Ebenso blieb der Anteil des über DC erfaßbaren nicht oxidierten Tabersonin vor und nach Überführen des Oxidationsansatzes ins wässrige Puffersystem gleich. Plausibel erscheint deshalb die Reaktion von oxidierten Tabersonin-Spezies miteinander, etwa die eines Carbinolamins mit einem Iminium-Salz (Schema 21).



Schema 21: Möglicher Weg von Iminium-Tabersonin zu den Hydroxy-Voafrinen. Dargestellt ist jeweils nur der Ring D

Diese Vorgänge ließen sich in Analogie mit der Reaktion einer Nitrilform mit Iminiumtabersonin sehen.

Große Ähnlichkeiten zu den Tabersonin-Dimeren weist ein von der Arbeitsgruppe um ROSAZZA charakterisiertes Vindolin-Dimere auf (NABIH *et al.*, 1978). Dabei konnte unter Verwendung verschiedener Oxidationssysteme mit auch unterschiedlichen Oxidations-Mechanismen immer das identische dimere Produkt verzeichnet werden (SARIASLANI *et al.*, 1984). Primär liegt dabei ebenfalls eine Iminiumform vor, die nur nach Acetylierung der 16-Hydroxylgruppe des Vindolin faßbar ist (SARIASLANI und Mitarb., 1985). Ansonsten reagiert diese Hydroxylgruppe sofort mit der konjugierten En-Immoniumstruktur im Ring D des Vindolin zum innermolekularen Ether weiter (DIATTA *et al.*, 1975). Erst das resultierende Enamin reagiert dann spontan zum 14,3'-verknüpften Vindolindimeren (GUSTAFSON und ROSAZZA, 1979). In Schema 22 ist diese wegen der 16-Hydroxylgruppe anders als beim Tabersonin ablaufende Reaktionsfolge illustriert.



Schema 22: Bildung der Vindolin-Dimere nach GUSTAFSON und ROSAZZA. Nur die C- und D-Ringe sind angegeben

Eine vergleichbare Enamin-Dimerisierung ist von der Synthese von Isochinolin-Alkaloiden her bekannt (BOBITT et al., 1965). Auch für das Bistabersonin Voacinol wird so eine Dienamin-Reaktion von zwei Dehydro-Secodineinheiten angenommen (GOVINDACHARI et al., 1987).

Auch die Bildung von Acetonyl-Addukten ist mit Enamin-Strukturen von Alkaloiden ebenso wie mit Iminiumformen möglich. So wurde bei mikrobieller Umsetzung von Vindolin auch 3-Acetonyl-Dihydrovindolinether erhalten (NEUSS et al., 1973a). Bei der Darstellung von Vindolin- und Vindorosin-Derivaten im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es sich dabei nicht nur um die Addition des Lösungsmittels Aceton (NEUSS et al., 1973b), sondern auch um eine eigenständige metabolische Leistung des Mikroorganismus *Streptomyces albobrisesolus* handeln kann.

Im direkten Vergleich der Reaktivität von Tabersonin und Vindolin in den von SARIASLANI et al. (1984) für Vindolin vorgestellten Systemen zeigte sich Vindolin reaktionsfreudiger als Tabersonin. So wurden aus Vindolin mehrere Produkte, unter anderem das in der Literatur beschriebene Dimere, erhalten. Von den in weitaus geringerem Maße gebildeten Tabersonin-Produkten konnte nur in einem Falle ein Voafirin identifiziert werden, einige andere nicht weiter verfolgte monomere Oxidations-Produkte waren daneben detektierbar. Mit diesen

Oxidationssystemen ging die Bildung der Vindolin-Dimeren also wesentlich leichter vonstatten.

Aus *C. roseus* dagegen sind solche Vindolin-Dimere jedoch nicht zu isolieren. Das Catharanthus-Alkaloid Vindolicin ist ein in den Stellungen 10,10' über eine Methylen-Brücke verknüpftes Bis-Vindolin (CORDELL, 1981). Ebenso sind Tabersonin -Dimere und -Trimere nicht in differenzierten Pflanzen aufgefunden worden, auch nicht in *C. roseus* oder in *Voacanga africana*. In *C. roseus* Zellkultur liegt, ebenso wie in der von *V. africana* Tabersonin vor (STÖCKIGT und SOLL, 1980; PAWELKA, 1985). Jedoch fanden sich nur in der Voacanga-Kultur die Voafrine. Schon bald wurde auch die artifizielle Bildung dieser dimeren Alkaloide in Erwägung gezogen. So zeigten STÖCKIGT et al. (1983) und PAWELKA (1985), daß sich Voafrin A und B nicht während der Aufarbeitung der Zellkultur von *V. africana* bilden. So führte zugefügtes ³H-Tabersonin nicht zu einer Markierung von Voafrinen, noch änderte sich das Verhältnis von Tabersonin zu Voafrinen bei Variation der Extraktionszeit. Auch eine Infektion der Zellkultur mit Mikroorganismen ließ sich nicht nachweisen. Wie wichtig dieser Aspekt ist, zeigte die erfolgreiche mikrobielle Umsetzung von Tabersonin zu den Voafrinen im Rahmen dieser Arbeit. Insoweit wurde von STÖCKIGT et al. (1983) auf eine enzymatische Bildung der Voafrine durch die Zellkultur als wahrscheinlichste Ursache abgestellt.

Eine Artefakt-Diskussion mit vielen Parallelen zu den Verhältnissen bei den Voafrinen läßt sich um den Status von Vinblastin als Naturprodukt verfolgen. Auch hier sind die wesentlichen Reaktionsfolgen über Iminium-Zwischenstufen realisiert. Nachdem auch hier spontane Kopplung von Iminium-Catharanthin und Vindolin chemisch (LANGLOIS et al., 1976) und enzymatisch in planta (SCOTT et al., 1978) zu Anhydrovinblastin beobachtet wurde, zeigte sich spontane Weiterreaktion in Chloroform (LANGLOIS und POTIER, 1978) sowie mit Proteinextrakt in vitro (SCOTT et al., 1978) zu Leurosin. Durch Luftoxidation von Anhydrovinblastin in Acrylnitril ließ sich schließlich das gesamte Spektrum von dimeren Catharanthus-Alkaloiden erhalten (LANGLOIS und POTIER, 1979).

Doch auch der Status von Anhydrovinblastin als Naturprodukt wurde hinterfragt. Außer im chemischen Modell kann die Kopplung von Vindolin mit Catharanthin auch durch Enzymsysteme wie Meerrettich-Peroxidase (GOODBODY *et al.*, 1988a) und Häm-Proteine (GOODBODY und andere, 1988b) erreicht werden. Dies schmälert die Leistung der Peroxidasen aus *C. roseus*, die ENDO *et al.* (1988) für diese Kopplung verantwortlich machen. Als primäres Reaktionsprodukt muß dabei - wie beim Tabersonin-System - ein Iminiumsalz angenommen werden, das von KUTNEY *et al.* (1988a) nachgewiesen werden konnte. Dieses Iminium-Salz ist auch in Catharanthus-Droge vorhanden und wird erst nach Reduktion mit NaBH_4 quantitativ als Anhydrovinblastin extrahiert (GOODBODY *et al.*, 1988c). Analoges läßt sich über die ausgeführten Enzymansätze mit Tabersonin aussagen. Für die Redoxprozesse, die zur Umwandlung von Anhydrovinblastin ins Vinblastin führen, wurde von ENDO *et al.* (1987a) eine durch NADH zu stimulierende Enzymaktivität in *C. roseus* aufgefunden. Vergleichbar ließen sich auch die Hydroxyvoafrine NADPH-abhängig enzymatisch zu den Voafrinen reduzieren. Eine Hemmung durch NADPH ist sowohl der Tabersonin-Kopplung wie auch der Verknüpfung von Catharanthin und Vindolin gemeinsam.

Bei der Kopplung von Catharanthin und Vindolin können mit Enzym-Rohextrakten aus Catharanthus-Zellkulturen unter optimierten Bedingungen, mit FAD und MnCl_2 maximal 18% Ausbeute an Bisindol-Alkaloiden erzielt werden (KUTNEY *et al.*, 1988c). Dagegen ist die hier aufgefundene Tabersonin-Umsetzung mit Rohextrakt aus der Pflanze mit etwa 60% erreichbarer Ausbeute wesentlich effektiver. Enzyme zur Catharanthin-Vindolin-Verknüpfung konnten unter anderem an dem Farbstoff Procion Red H-3B immobilisiert werden (KUTNEY *et al.*, 1988c). Auch eine Anreicherung der Kopplungsaktivität für Tabersonin erfolgte über Affinitätschromatographie an diesem Liganden. Doch zeigen pI-Werte zwischen 4,4 und 5,4 und ein Molekulargewicht von ca. 42.500 deutlich, daß keine Verwandtschaft mit den von ENDO *et al.* (1988) gereinigten Peroxidasen besteht. Diese weisen alkalische pI-Werte und ein MW von 37.000 auf. Ein Reaktionsmechanismus für die

enzymatische Oxidation von Tabersonin muß erst noch ermittelt werden; die im Rahmen dieser Arbeit noch durchgeführten Hemmstoff-Studien lassen keine Klassifizierung dieser Enzymaktivität zu.

Für Catharanthin und Vindolin vertreten ENDO et al. (1988) die Meinung, daß zwar die Oxidation von Catharanthin ein enzymatischer Prozeß ist, die Dimerisierung zu Anhydrovinblastin dagegen spontan verläuft. Diese Oxidation läßt sich auch mit Proteinextrakten aus *C. roseus*-Zellkulturen erreichen, die kein Vindolin und Vinblastin besitzen (KUTNEY et al., 1988a). Auch die Tabersonin-Dimerisierung ist mit Protein aus voafrinlosen Pflanzen und mit anderen Enzymsystemen zu erreichen und verläuft nach dem initialen Oxidationsschritt spontan. Ein Unterschied besteht in der Notwendigkeit, daß beide Reaktionspartner in oxidiertem Zustand vorliegen, was auch für die Dihydrovindolinether-Dimeren gilt (GUSTAFSON et al., 1979).

Bei der differenzierten Catharanthus-Pflanze ist eine Anpassung an die mitosehemmende Wirkung des Vinblastin und dessen Vorläufer gegeben (CONSTABEL et al., 1981). Auch wurde Anhydrovinblastin unter beibehaltener Kompartimentierung im Fütterungsexperiment gebildet (SCOTT et al., 1978). Diese Kompartimentierung ist in *V. africana* Zellkulturen möglicherweise verändert, im Enzymrohextrakt sicherlich aufgehoben. Aber auch eine erst unter den Bedingungen der Zellkultur realisierte Fähigkeit, Voafrine zu bilden, muß in Betracht gezogen werden.

Neben den Tabersonin-Dimeren wurde bei den vorliegenden Untersuchungen auch ein Tabersonin-Trimeres, 3 α -Tabersonyl-Voafrin B, aufgefunden. Mit einem Molekulargewicht von 1005 ($C_{63}H_{89}N_6O_6$) ist es größer als alle bisher bekannten, bei CORDELL (1981) und STAPLEFORD (1985) angeführten, auch polymeren Indolalkaloide. Als nächst größeres Molekül ist hier das Vindolin-Dimere Vindolicin (MW 926) zu nennen, mehr repetitive Strukturelemente besitzt das Tryptamin-Pentamere Psychotridin (MW 862).

Ein Tetramer aus Tabersonin konnte weder aus enzymatischen noch aus chemischen Ansätzen isoliert werden. Ob die Bildung dieser weiteren Verknüpfung an den sterischen Bedingungen scheiterte, wurde mit computergestützter Molekülgraphik untersucht. Bei den Voafrinen konnte dabei eine eingeschränkte Drehbarkeit um die 14,3'-Bindung festgestellt werden. Die Anordnung der Tabersonyl-Einheiten zueinander ist also schon durch die räumlichen Verhältnisse beim Bindungsschluß und nicht durch eine besonders energetisch günstige Konformation bestimmt. In Bezug auf weitere Kopplungsprodukte konnten nur noch 3 α -Tabersonyl-Voafrin B existenzfähige Konformere zugewiesen werden. Die Bildung anderer Trimere und Tetramere war also sterisch verhindert.

Solche computergraphischen Untersuchungen sind als quantitativ auswertbare Erweiterung des nur haptisch erfahrbaren Dreiding-Modells besonders für den Vergleich von Strukturen wertvoll. Jedoch bedarf die Auswertung einer so durchgeführten Konformations-Analyse oftmals weiterer Daten, die nicht immer zugänglich sind. So ist die Konformation des 3 β -OH-Epimeren von Hydroxyvoafrin B in DMSO abhängig vom Wassergehalt des Lösungsmittels; der Energiebetrag, der von der Wasserstoff-Brückenbindung geliefert die Deformation von van der Waals-Radien im Molekülgerüst erlaubt, ist auch Lösungsmittel-abhängig. Zudem kann er nicht in die Kraftfeldberechnung der Molekül-Konformation mit eingehen (FRÜHBEIS *et al.*, 1987). Die ausschließliche Stabilität des 3 α -OH-Epimeren in Abwesenheit von Wasser ist ebenso mit diesen Berechnungen nicht vorhersehbar. Strukturen, die NMR-spektroskopisch in wasserfreien Lösungsmitteln untersucht werden, müssen also nicht notwendigerweise auch im wässrigen Milieu so vorliegen.

Sinnvoll ist eine Berechnung von Konformationsenergien sicherlich, wenn es sich um freie oder eingeschränkte Rotation um Bindungen geht. Dadurch lassen sich zuverlässigere Ergebnisse als mit zeit- und kostenaufwendig zu erstellenden Dreiding-Modellen erhalten. Sind zudem noch sterische Vorbedingungen und Bildungsenergie des Rezeptor/Agonist-Komplexes bekannt, lassen sich mit diesen Daten auch z.B. die

Wirkung verschiedener Herzglykoside nachvollziehen (WATSON et al., 1984). So sind auch Konformere wirksam, die nicht ein in Lösung vorliegendes Energie-Minimum darstellen, deren berechnete Energiebarriere jedoch bei der bekannten Wechselwirkung mit dem Rezeptor überkompensiert wird. Ebenso wie bei der sonstigen Quantifizierung von Struktur/Wirkungsbeziehungen (KUBINYI, 1986), ist die computergestützte Molekülgraphik bisher nur in homologen Reihen prospektiv anwendbar.

Da bei aufgehobener Kompartimentierung Tabersonin nicht in Richtung Vindolin durch *C. roseus* Proteinextrakt verändert wurde, kam auch eine membrangebundene Proteinfraction zum Einsatz; auch hier zeigten sich die Voafrine als Umsetzungs-Produkte von Tabersonin, jedoch war diese Reaktion nicht durch NADPH gehemmt. Möglicherweise ist eine lösliche Reduktase vorhanden, die Iminium-Tabersonin wie Hydroxy-Voafrine in die korrespondierenden Amine überführen könnte.

In einem Aufschluß, in dem weitergehende Kompartimentierung aufrechterhalten wurde, konnte in subzellulären Strukturen ausschließlich der Vindolin-Vorläufer 11-Methoxytabersonin (SCOTT, 1970; DELUCA et al., 1986) im Rahmen dieser Arbeit als Spurenalkaloid hoch angereichert werden. Methoxytabersonin ist als Vorläufer auch für in *C. roseus* Zellkulturen aufgefundene Alkaloide wie Hörhammerinin (STÖCKIGT und SOLL, 1980) denkbar. Eine spezifische Kompartimentierung dieses Intermediates in *C. roseus* Pflanzen läßt Regulationsmechanismen besonders an dieser Stelle der Vindolin-Biosynthese vermuten.

Um nun auch Enzymsätze spezifisch für den Vindolin-Weg verfolgen zu können, wurden aus Vindolin und dessen Desmethoxy-Verwandten Vindorosin durch mikrobiellen Abbau O- und N-Demethyl-Derivate dargestellt. Die weiter erhaltenen Deacetyldemethyl-Abkömmlinge waren vorher noch nicht beschrieben worden.

Mit Hilfe dieser neuen Substrate wurden zwei Enzyme der Vindolin-Biosynthese aufgefunden, eine 17-O-Acetyltransferase (FAHN et al., 1985a; gleichzeitig mit DELUCA et al., 1985)

sowie eine 11-O-Methyltransferase (FAHN et al., 1985b). Die Tätigkeit der 11-O-Methyltransferase wurde zwar lediglich im Protein-Rohextrakt demonstriert, jedoch genügte die festgestellte Substratspezifität für eine Einordnung in die Biosynthese-Sequenz. So verhindert die 17-O-Acetylgruppe diese Methylierung; sie muß also vor der Acetylierung erfolgen (FAHN et al., 1985b).

Die Acetyltransferase wurde dagegen zur Homogenität gereinigt und eingehend charakterisiert. Als ein Enzym der Vindolin-Biosynthese weist sie eine hohe Substratspezifität für Vindolin-Vorläufer aus. Die Transferase ist hoch affin zu diesen Substraten ($K_m < 1 \mu\text{Mol}$) und eng mit der Verteilung des Vindolin in der Pflanze (WESTEKEMPER et al., 1980) korreliert.

Zur Reinigung wurden zwei aufeinanderfolgende Affinitäts-chromatographische Schritte und eine hydrophobe Chromatographie durchgeführt. Mit dieser so bereits ca. 1300 fach angereicherten Enzympräparation wurden die Eigenschaften der Acetyltransferase bestimmt. Zu homogenen Enzymfraktionen gelangte man erst durch eine nachfolgende isoelektrische Fokussierung. Hierbei wurde die Transferase-Aktivität 5 Proteinspezies mit pI-Werten zwischen pH 4,6 und 5,0 zugewiesen. Im günstigsten Falle konnte für eines dieser Proteine eine Anreicherung von ca. 3500 fach errechnet werden, die anderen Banden zeigten geringere spezifische Enzymaktivität.

Ein breites pH-Optimum zwischen pH 8 und 9 und ein durch Gelfiltration bestimmtes Molekulargewicht von ca. 44.000 finden sich in Übereinstimmung mit von DELUCA et al. (1985) angegebenen Werten für dieses Enzym. Diese Autoren ermittelten ein MW von 45.000 und ebenfalls höchste Aktivität im pH-Bereich von 8 - 9. Allerdings wurde durch Chromatofokussierung im pH-Gradient 5,9 - 4,2 Aktivität in Eluat von pH 4,4 bis 4,8 gemessen und so ein pI-Wert von 4,6 bestimmt. Insgesamt wurde so die Acetyltransferase von dieser Arbeitsgruppe lediglich 365 fach angereichert.

Da demnach das Vorliegen verschiedener Acetyltransferase-Formen nur durch isoelektrische Fokussierung nachzuweisen war, mußte die Bildung von Artefakten während der Reinigung und speziell diesem Reinigungsschritt ausgeschlossen werden. Proteolytischer Abbau, der zum Vortäuschen verschiedener Formen führen konnte (MARKERT und WHITT, 1968), wurde durch Protease-Inhibitoren vermieden. Wiederholte Fokussierungen im analytischen Gelen mit Trägerampholyten und immobilisierten pH-Gradienten zeigten deutlich unterschiedliche pI-Werte für die Acetyltransferase-Aktivität. Längere Vorinkubationen der Enzymprobe führte ebenso wenig zu einem veränderten Fokussierungs-Muster wie Behandlung mit alkalischer Phosphatase. Aufarbeitung und Fokussierungs-Bedingungen waren somit nicht ursächlich für die Beobachtung dieser verschiedenen Aktivitäts-Banden. Die SDS-Gelelektrophorese zeigte für jede dieser Formen einheitlich je zwei lose assoziierte Untereinheiten mit unterschiedlichen Molekulargewicht von 20.000 und 29.000. Mit überaus beträchtlichem Aufwand wurden aus 16 kg Blättern jeweils die beiden unterschiedlichsten Transferase-Formen isoliert. Nach nochmaliger Auftrennung in die beiden Untereinheiten scheiterte eine Ansequenzierung an der N-terminalen Blockade aller dieser 4 Polypeptide.

Als Ursache für die beobachtete Multiplizität der Acetyltransferase kommen somit Permutationen verschiedener Untereinheiten jeweils gleicher Größe und unterschiedliche weitere Modifikationen, wie eben für den N-Terminus beider Untereinheiten nachgewiesen, in Frage. Die Existenz alleler Gene bei *Catharanthus roseus* wurde bei der Untersuchung multipler Formen der Strictosidin-Synthase ausgeschlossen (U.PFITZNER, 1984). Somit kann, wie schon für die ebenfalls aus *C. roseus* Pflanzen sowie auch Zellkulturen isolierte Strictosidin-Synthase, die am Anfang dieser Biosynthese-Sequenz steht, keine genaue Ursache für die Auftrennung der Acetyltransferase-Aktivität bei der isoelektrischen Fokussierung angegeben werden. Als Bezeichnung für diese Proteinspezies wird deshalb der Begriff "multiple Formen"

(IUPAC, 1977) vorgeschlagen. Eine N-terminale Modifikation wurde für Enzyme der Indolalkaloid-Biosynthese sonst noch für die Strictosidin-Synthase aus *R. serpentina* Zellkultur festgestellt (HAMPP, 1986).

Die kinetischen Daten der Acetyltransferase wurden ohne Auftrennung in die multiplen Formen ermittelt. Dabei zeigten sich für Kaliumphosphat- und Hepes-Puffer bei selbem pH-Wert unterschiedliche Affinität zu AcetylCoenzym A. In Kaliumphosphat-Puffer betrug dieser K_m -Wert 25 μ M, in Hepes nur 5 μ M. Der K_m -Wert für das Alkaloid-Substrat, 17-O-Deacetyl-Vindolin, betrug in beiden Puffern gleichermaßen 0,6 μ M. Ebenso wurde PropionylCoA (K_m in Hepes 10 μ M) und eine Reihe weiterer Vindolin- und Vindorosin-Derivate als Substrat angenommen. Dabei zeigten sich in der Akzeptanz von Vindorosin-Deacetylformen ($K_m \approx 0,2 \mu$ M) und entsprechenden Vindolin-Abkömmlingen (K_m 0,6 - 0,9 μ M) kaum signifikante Unterschiede. Eine Einordnung der Acetyltransferase als terminaler Schritt in der Biosynthese-Sequenz wurde im Wesentlichen durch fehlende Methylierung der N-Deethyl-Derivate durch Catharanthus-Protein abgesichert. Zusammen mit der Substratspezifität der O-Methyltransferase für die Deacetyl-Verbindung und der vor N-Methylierung zu erfolgenden 2,16 Reduktion war dieser Acetylierungsschritt als Abschluß zwingend (FAHN et al., 1985a; 1985b).

Die Coenzym A-abhängige Rückreaktion zeigte mit 25 μ M in Kaliumphosphat-Puffer denselben K_m -Wert wie für die Hinreaktion, die von Coenzym A mit einer Inhibitor-Konstanten von 8 μ M gehemmt wurde. Fehlende Hemmung durch Vindolin sowie kompetitive Hemmung durch CoA bei Variation von AcetylCoA und nichtkompetitive Hemmung bei verschiedenen 17-O-Deacetyl-vindolin-Konzentrationen führten zu der Annahme eines geordneten sequentiellen Reaktionsablaufes. Bei dieser Zwei-Substrat-Reaktion wird demnach erst das Leitsubstrat AcetylCoA an das Enzym gebunden, bevor die Umsetzung von 17-O-Deacetyl-Vindolin erfolgt. Mit einer Wechselzahl von mindestens 500/min, ermittelt für die am aktivsten erhaltene multiple Form, erreicht die Acetyltransferase schon beinahe Werte, wie

sie für Primärstoffwechsel-Enzyme üblich sind. Zum Vergleich besitzt die Succinat-Dehydrogenase eine Umsatzrate von 1150/min. Zusammen mit der niedrigen Michaelis-Konstanten erklärt dies die Abwesenheit von 17-O-Deacetylvindolin in Alkaloid-Extrakten aus frischer *C. roseus*-Droge.

Essentiell für die Aktivität der Acetyltransferase sind Sulfhydryl-Gruppen. Typische Hemmstoffe für diese Strukturen sowie Schwermetalle zeigten Inaktivierung dieses Enzyms. Die Stabilität gereinigter Fraktionen wurde dagegen durch Oxidationsschutz verbessert. Ähnliches Verhalten weist beispielsweise eine O-Methyltransferase aus *Mentha piperita* auf (CROTEAU und HOOPER, 1978).

Da nur in photosynthetisch aktiven Pflanzenteilen Vindolin und die Acetyltransferase detektiert wurden, lag es nahe, eine Lokalisation dieses Enzyms in den Chloroplasten zu überprüfen. Dieses Kompartiment ist auch an der Biosynthese der Chinolizidin-Alkaloide beteiligt (WINK und HARTMANN, 1982). Eine Chloroplasten-Präparation zeigte jedoch keine enzymatische Acetylierung von 17-O-Deacetylvindolin.

Daneben konnte eine Esterase-Aktivität, die CoA-unabhängig die Hydrolyse der 17-O-Acetylgruppe im Vindolin bewerkstelligt, nicht mit der Vindolinbiosynthese korreliert werden; ebenso war diese Ester-Hydrolyse keine spezifische Leistung von *Catharanthus*-Protein.

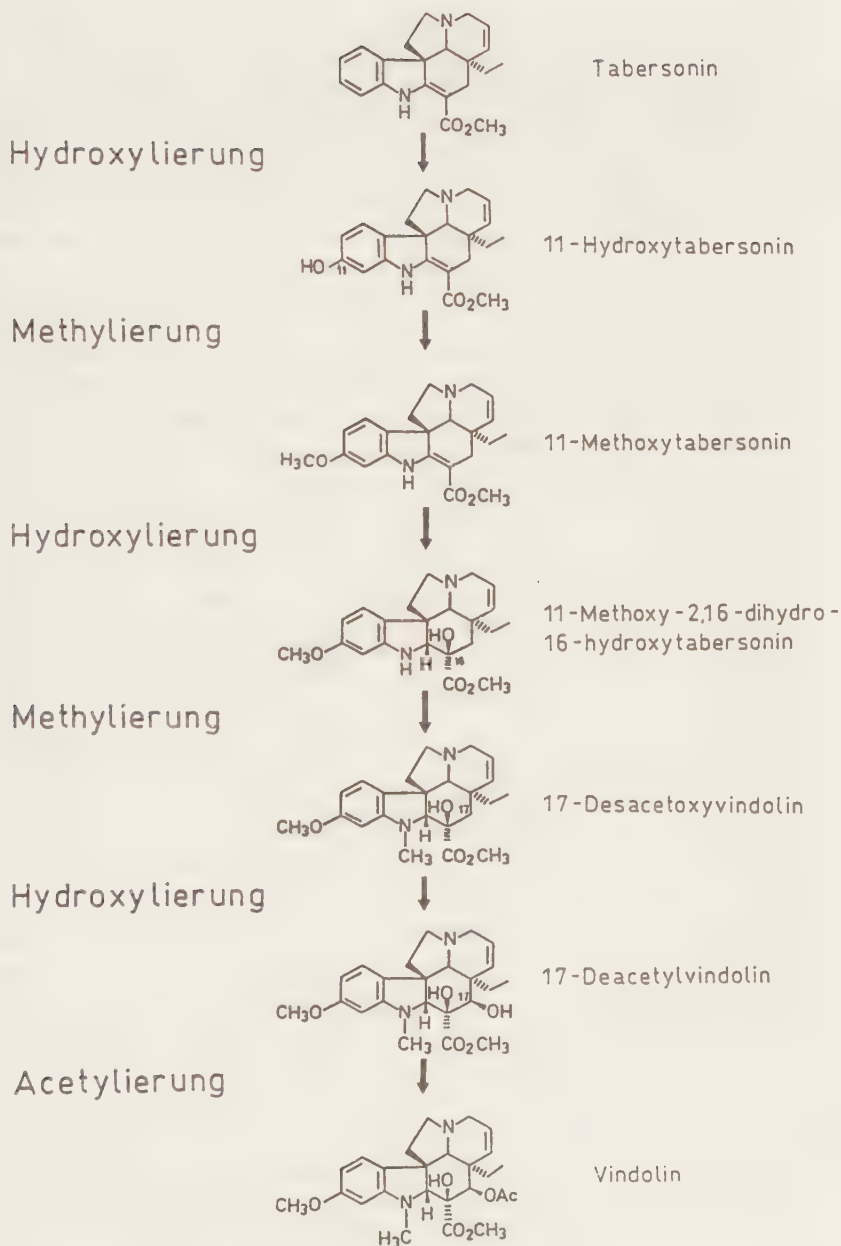
Für diese Untersuchungen der Esterhydrolyse wurde an der Acetylgruppe radioaktiv markiertes Vindolin enzymatisch mit der Acetyltransferase hergestellt. Mit einer spezifischen Aktivität von 5,8 GBq/mmol ^3H -Vindolin war diese Substanz zwar weniger hoch markiert als die für einen Vindolin-Radio-Immuno-Assay von WESTEKEMPER et al. (1980) benutzte Tracersubstanz mit 529,1 GBq/mmol ^3H -Vindolin. Jedoch verwendeten KUTNEY und Mitarb. (1980b) für dieselbe Bestimmungsmethode ein mit 3,37 GBq/mmol markiertes ^3H -Vindolin. Mit entsprechend hoch markiertem Cosubstrat ist also durch diese Acetyltransferase eine einfache Herstellungsmöglichkeit von markiertem Vindolin für diesen Verwendungszweck gegeben.

Betrachtet man die 17-O-Acetylgruppe im Vindolin bezüglich der biologischen Wirkung des therapeutisch eingesetzten Vinblastin, so ist auch Deacetylvinblastin in seinem Effekt im Leukämie-Tiermodell dem Vinblastin vergleichbar (BARNETT *et al.*, 1978). Auch *in vitro* wird gleichermaßen Assoziation mit Tubulin-Dimeren mit und ohne diese Acetylgruppe beobachtet (NA und TIMASHEFF, 1981). Von den unzähligen nachfolgenden Molekülvariationen war diese Acetylgruppe die erste Teilstruktur des Vinblastin, an der systematisch Änderungen vorgenommen und die cytostatischen Aktivitäten verglichen wurden (HARGROVE *et al.*, 1964). Die Acetyltransferase akzeptiert Deacetylvinblastin nicht als Substrat, ein weiterer Hinweis für die Kopplung von Catharanthin mit intaktem Vindolin zum Vinblastin.

Eine Hemmung der Transferase durch Vindolin, dem Endprodukt der Sequenz, konnte nicht festgestellt werden. Für eine Regulation werden schon Enzyme des Terpenoid-Stoffwechsels beeinflusst. So wird die Geraniol-10-Hydroxylase durch Catharanthin, und die Loganinsäure-Methyltransferase durch Vindolin gehemmt (MCFARLANE *et al.*, 1975).

Die gesamte Biosynthese-Sequenz zwischen Tabersonin und Vindolin kann heute durch die gleichzeitig mit dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von DELUCA und Mitarbeitern als aufgeklärt gelten. Darüber hinaus wurden, nimmt man die multiplen Formen der Acetyltransferase aus, sämtliche hier dazu vorgestellten Ergebnisse auch von dieser Arbeitsgruppe bestätigt.

Entscheidend für die Festlegung dieser Sequenz war dabei das Intermediat 17-Desacetoxy-Vindolin, das aus dunkel gehaltenen Keimlingen isoliert wurde (BALSEVICH *et al.*, 1986). In sequentiellen Analysen von Alkaloiden (DELUCA *et al.*, 1986) und Enzymaktivitäten (DELUCA *et al.*, 1988) aus Keimlingen wurde die Abfolge Tabersonin, Hydroxy-Tabersonin, Methoxy-Tabersonin, Desacetoxy-Vindolin festgestellt.



Schema 23: Biosynthese von Vindolin nach DELUCA *et al.*

Die Acetyltransferase, durch Licht induzierbar, war erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiv und vervollständigte die Sequenz zum Vindolin. Das Auffinden einer N-Methyltransferase, die keine in Stellung 17 hydroxylierten Verbindungen akzeptiert (DELUCA et al., 1987) untermauerte das Abwechseln von Hydroxylierungs- und Methylierungs- bzw. Acetylierungsschritten, wie es in Schema 23 wiedergegeben ist.

Auch die zelluläre Lokalisation der Acetyltransferase wie der N-Methyltransferase wurde von dieser Arbeitsgruppe untersucht. In den Chloroplasten wurde ebenfalls keine Acetyltransferase, jedoch die N-Methyltransferase aufgefunden. Die Acetyltransferase wurde dem Cytosol zugeordnet (DELUCA und CUTLER, 1987). Dies macht Sinn, da das Produkt der Acetyltransferase-Reaktion durch spezifische Transportmechanismen in die Vakuole weitergeleitet wird (DEUS-NEUMANN und ZENK, 1985).

Trotz dieser neuen Erkenntnisse sind bisher alle Versuche, Vindolin in Zellsuspensionen von *C. roseus* zu gewinnen, fehlgeschlagen. So blieb Medienoptimierung zur Alkaloid-Produktion (ZENK et al., 1977; KNOBLOCH und BERLIN, 1980; MERILLON et al., 1986; BERLIN et al., 1987) bezüglich Vindolin erfolglos. Weiter gelang keine Induktion durch abiotische (SMITH et al., 1987b; FALLEVI und DICOSMO, 1988) und biotische Elicitoren (EILERT et al., 1986; BERLIN et al., 1987) noch durch Bioregulatoren (KUTNEY et al., 1987). Auch Variation von Phytohormonen im Medium (MORRIS, 1986b; BERLIN et al., 1987; SMITH und Mitarb., 1987a) hatte keinen Einfluß auf die Vindolinbildung. Eine mäßige Steigerung der Catharanthin-Produktion auf 85 mg/l Kulturmedium konnte so immerhin erzielt werden (SMITH et al., 1987a). Obwohl BODER und andere (1964) Tumorkallus mit Vindolin beschrieben hatten, zeigten auch ebenfalls auxinautotrophe Zellkulturen kein detektierbares Vindolin (EILERT et al., 1987). Selbst photoautotrophe *C. roseus* Zellkulturen, erfolgversprechend, da die N-Methyltransferase in Chloroplasten lokalisiert ist, und die Acetyltransferase durch Licht induziert wird (DELUCA und CUTLER, 1987), synthetisierten kein Vindolin (TYLER et al., 1986).

Trotzdem muß die zur Vindolin-Biosynthese nötige Zelldifferenzierung nicht unlösbar mit der Organogenese verbunden bleiben. Dies zeigt das Beispiel der Herzglykosid-Produktion in *Digitalis lanata* Zellsuspension, wo jüngst eine solche Unterscheidung gelungen ist (LUCKNER und DITTRICH, 1987).

V. Zusammenfassung

1. Zur Untersuchung der N-Methyltransferase aus der Ajmalin-biosynthese in *Rauwolfia serpentina* wurden die Substrate Norajmalin und Acetylnorajmalin ausgehend von Ajmalin mikrobiell mit *Streptomyces platensis* dargestellt. Die N-Methyltransferase wurde als partikelassoziiertes Enzym identifiziert. Eine Solubilisierung der Enzymaktivität gelang mit Triton X-100. Ein Vergleich der Substrate Norajmalin und Acetylnorajmalin erbrachte für Acetylnorajmalin nur 40% der Umsatzrate, die für Norajmalin zu erzielen war. Bevorzugt ist demnach die Sequenz mit der N-Methylierung von Norajmalin als Abschlußreaktion der Ajmalin-Biosynthese.

2. Im Rahmen der Untersuchungen zur Vindolin-Biosynthese wurde aus der Fruchtwand von *Catharanthus roseus* ein Hauptalkaloid isoliert, das in den Blättern nicht vorhanden ist. Die Struktur konnte soweit erhellt werden, daß ein Intermediat-Charakter dieses Alkaloids bezüglich der Vindolin-Sequenz auszuschließen ist.

3. Der Vindolin-Vorläufer 11-Methoxy-Tabersonin wurde hoch angereichert, wenn subzelluläre Strukturen durch die Aufschlußmethodik erhalten blieben. Daraus läßt sich eine Kompartimentierung dieses Intermediates nicht im Cytosol ableiten.

4. Die Ausgangsverbindung des untersuchten Abschnittes in der Vindolin-Biosynthese, Tabersonin, wurde durch enzymatische und chemische Oxidation zu insgesamt zwölf dimeren und zwei trimeren Alkaloiden umgesetzt. Von den dimeren Produkten sind Voafirin A und B, 14-(3'-Tabersonyl)-Tabersonine, erst einmal als Naturstoffe isoliert worden. Neu hinzu kamen die jeweiligen 3 α -hydroxylierten Derivate dieser Verbindungen. Ebenso waren die Trimere, 3 α -(14''-Tabersonyl)-Voafirin B sowie dessen 3'' α -Hydroxy-Derivat, bisher unbekannt. Diese stellen die derzeit größten Indolalkaloide dar, nur durch einige Steroid-Alkaloide übertroffen (MW 1005; C₆₃H₆₈N₆O₆; bzw. MW 1021; C₆₃H₆₈N₆O₇). Diese Alkaloide, von denen bisher nur die dimeren Voafirine in Spuren aus Zellkulturen von *Voacanga*

africana zugänglich waren, sind nun erstmals durch Partialsynthese aus Tabersonin im Gramm-Maßstab erhältlich.

4.1. Die Bildung dieser Alkaloide durch Proteinextrakt aus *C. roseus* stellt eine Sauerstoff-abhängige Dehydrierung dar, die durch NADPH verhindert wird. Das oxidierende Enzym wurde chromatographisch 250 fach angereichert und ein Molekulargewicht von ca. 42.500 durch Gelfiltration ermittelt. Durch isoelektrische Fokussierung wurden verschiedene Formen mit pI-Werten von 4,4 bis 5,4 bestimmt. Durchgeführte Hemmstoff-Versuche lassen noch keine Rückschlüsse zur Klassifizierung der Enzymreaktion zu.

4.2. Durch chemische Oxidation wurden insgesamt vier neue Kopplungsprodukte von Tabersonin erhalten. Photooxidation erbrachte bisher unbekannte Tabersonin-Dimere mit 3,3'- und 15,15'-Verknüpfung. Umsetzung mit Quecksilber-II-acetat führte zu denselben, über die Positionen 14,3' bzw. 14'',3 verbundenen Produkten, wie die Enzymreaktion. Diese chemische Methode könnte weiterentwickelt werden, um die enzymkatalysierte Partialsynthese zu ersetzen.

4.3. Eine Iminium-Form des Tabersonin als primäres Produkt der chemischen und enzymatischen Oxidation wurde indirekt nachgewiesen. Dies geschah durch Addukt-Bildung mit Aceton und Cyanid-Ionen. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Iminium-Tabersonin, aus dem 3 α -Nitril mit Ag₂CO₃ freigesetzt oder als Oxidationsprodukt mit Hg(OAc)₂, spontan die 14,3'-Verknüpfung ausbildet. Dabei mußten beide Reaktionspartner zum Iminium aufoxidiert oder einer der Partner in Stellung 3 mit einer elektronenziehenden Gruppe substituiert sein.

4.4. Die Produkte der enzymatischen wie der chemischen Oxidation liegen offenbar primär als Iminium-Salze im wässrigen Reaktionsansatz vor. Nur ein Teil wird bei der Aufarbeitung als Carbinolamine extrahiert. Die Reduktion dieser Formen kann mit NaBH₄ oder enzymatisch mit Proteinextrakt aus *C. roseus* und NADPH erfolgen. Letztere Möglichkeit steckt den Weg einer möglichen Biosynthese der Voafrine ab.

4.5. Computergraphische Arbeiten an diesen dimeren und trimeren Alkaloiden zeigten eine eingeschränkte Drehbarkeit um die 14,3'-Bindung. Existenzfähige Konformere für trimere Tabersoninderivate konnten nur für das vorgefundene 3 α -Tabersonyl-Voafrin B und dessen 3 α -Hydroxy-Derivat ermittelt werden. Tetramere des Tabersonin sind aus sterischen Gründen ausgeschlossen. Damit sollte mit dem Tabersonin-Trimeren bereits die Obergrenze dieser homologen Verknüpfungen erreicht sein.

5. Vindolin und Vindorosin-Derivate wurden mikrobiell mit *Streptomyces albogriseolus* und *Sepedonium chrysospermum*, kombiniert mit chemischer Deacetylierung, dargestellt. Die Deacetyl-Demethyl-Produkte wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Acetonyladdukte mit den eingesetzten Alkaloiden konnten mit *S. albogriseolus* ohne exogen zugeführtes Aceton beobachtet werden.

6. Die S-Adenosyl-Methionin-abhängige 11-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.-) der Vindolin-Biosynthese wurde in *C. roseus* Protein-Rohextrakt demonstriert und eine Substrat-Spezifität dieses Enzyms für 17-O-Deacetylsubstrate festgestellt.

7. Eine unspezifische Esterase-Aktivität, die Vindolin deacetyliert, wurde in *C. roseus* Zellkultur *in vivo* gezeigt und im Proteinextrakt von Pflanze und Zellkulturen quantitativ erfaßt. Diese Enzymaktivität konnte nicht mit der Vindolin-Biosynthese korreliert werden. Möglicherweise ist sie für das Auffinden von 17-O-Deacetyl-Vindolin aus *C. roseus*-Droge verantwortlich. Eine Esterase-Aktivität, die die 17-O-Acetylgruppe des Vindolin abspaltet, ist aber keine spezifische Leistung von Catharanthus-Protein und konnte auch in zahlreichen Leber-Präparationen nachgewiesen werden.

8. Die AcetylCoA: 17-O-Deacetyl-Vindolin - 17-O-Acetyltransferase (EC 2.3.1.-) der Vindolinbiosynthese wurde zur Homogenität gereinigt und physikochemisch wie kinetisch charakterisiert. Durch Korrelation mit der Vindolin-Verteilung in der Pflanze und durch die hohe Substratspezifität war sie eindeutig der Biosynthese des Vindolin zuzuordnen. Weder war

membrangebundene Acetyltransferase-Aktivität zu detektieren, noch fand sich das Enzym in Chloroplasten. Zusammen mit den Ergebnissen aus der weiteren Untersuchung dieses Biosyntheseweges konnte die Acetylierung als abschließender Schritt der Sequenz eingeordnet werden. In Vindolin-losen Zellkulturen von *C. roseus* konnte dieses Enzym nicht aufgefunden werden. Präparativ nutzbar ist es zur hohen radioaktiven Markierung von Vindolin an der Acetylgruppe, z.B. als Tracer-Substanz für Vindolin-Radioimmunoassays.

8.1. Die Reinigung des Enzyms erfolgte über Chromatographie an zwei Affinitäts- und einem hydrophoben Medium, die alle selbst hergestellt wurden. Eine abschließende isoelektrische Fokussierung trennte die Enzymaktivität in multiple Formen auf. Die dabei am höchsten angereicherte Form erreichte eine Aufreinigung um den Faktor $3,5 \times 10^3$ bei einer spezifischen Aktivität von 187 nkat/mg Protein mit einer Ausbeute von 7% bezogen auf die Gesamtaktivität. Insgesamt war die Wiederfindungsrate nach der Fokussierung 16%. Für die höchstgereinigte multiple Form ergibt sich unter der Annahme von einem aktiven Zentrum pro Enzym eine Wechselzahl von mindestens 500/min.

8.2. Durch Gelfiltration ließ sich für die Acetyltransferase ein Molekulargewicht von ca. 44.000 ermitteln, dagegen wurden in der SDS-Elektrophorese zwei lose assoziierte Untereinheiten von 20.000 und 29.000 MW erhalten. Bei nativer Elektrophorese blieben diese Untereinheiten assoziiert (MW $\approx$ 49.000).

8.3 Die Acetyltransferase besitzt mindestens 5 durch IEF trennbare multiple Formen (pI 4,6 - 5,0). Als Ursache für dieses Verhalten wurde Modifikation durch Proteasen oder Konformer-Bildung während der Fokussierung ausgeschlossen. Weitere Möglichkeiten bleiben Permutationen der Untereinheiten und Protein-Modifikationen. Für die unterschiedlichen Acetyltransferase-Aktivitäten wurde deshalb als Bezeichnung "multiple Formen" gewählt.

8.4 Eine Ansequenzierung der Acetyltransferase wurde versucht. Die beiden unterschiedlichsten multiplen Formen (pI 4,6 und 5,4) konnten aus 16 kg Blättern zu je ca. 100 µg gewonnen und nach Auftrennung in die Untereinheiten zur Ansequenzierung in der Gasphase eingesetzt werden. Diese vier Polypeptide waren alle N-terminal blockiert.

8.4 Enzymkinetische Untersuchungen der Acetyltransferase ergaben eine hohe Substratspezifität. Nur Aspidosperma-Alkaloide ohne 2,16-Doppelbindung und mit 17-Hydroxyl-Gruppe werden acetyliert. Für diese Substrate wurden sehr niedrige K_m -Werte ermittelt, die sich alle nicht signifikant unterscheiden (0,2 - 0,9 µM). Neben AcetylCoA (K_m 5 µM) wird auch noch PropionylCoA (K_m 10 µM) als Cosubstrat akzeptiert.

8.5 Eine Coenzym A-abhängige Rückreaktion der Acetyltransferase wurde charakterisiert. Wie für die Hinreaktion liegt das pH-Optimum zwischen pH 8 und 9. Noch bei pH 6 und 10 werden 50% der Reaktionsgeschwindigkeit beibehalten.

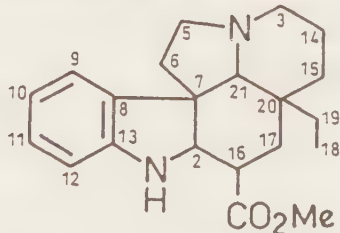
8.6 Bei der Acetylierung durch die 17-O-Deacetylvindolin - Acetyltransferase fungiert AcetylCoA als Leitsubstrat bei einer Zwei-Substrat-Reaktion mit geordneter Abfolge. Eine Hemmung durch Vindolin war nicht feststellbar. Dagegen zeigte Coenzym A mit einer Inhibitor-Konstante von 8 µM gegenüber AcetylCoA kompetitive, gegenüber 17-O-Deacetyl-Vindolin nichtkompetitive Hemmung.

8.7. Die Acetyltransferase wird durch Sulfhydryl-Reagenzien sowie Schwermetalle inaktiviert. Unter Oxidationsschutz und Lagerung bei 0 °C betrug die Halbwertszeit der gereinigten Enzymaktivität zwei Wochen.

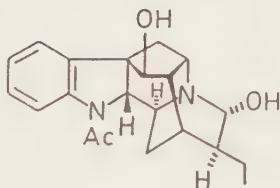
VI. Anhang mit spektroskopischen Daten der besprochenen Alkaloide

(Mit * gekennzeichnete Verbindungen sind hier erstmals beschrieben.)

Numerierung des Aspidosperman-Gerüsts



N-Acetylnorajmalin

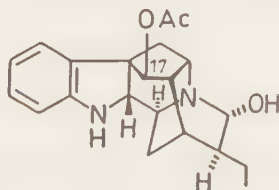


CAS rot

DC LM A: R_f 0,2

EI-MS m/z (rel. Int.%): 354 (M⁺, 20), 312 (36), 297 (17), 239 (20), 222 (20), 211 (34), 182 (65), 169 (54), 168 (63), 154 (100), 143 (41), 130 (59), 117 (34), 110 (41).

17-O-Acetylnorajmalin



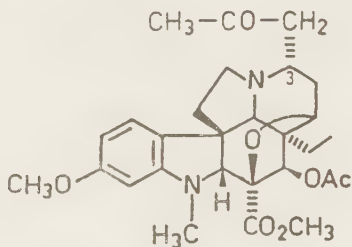
CAS orange, fluoreszierend 360 nm

DC LM A: R_f 0,2

UV (MeOH) λ_{max}: 286, 238 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 354 (M⁺, 14), 339 (4), 293 (5), 265 (5), 224 (16), 208 (8), 196 (15), 182 (30), 180 (30), 169 (70), 168 (100), 156 (17), 143 (30), 130 (49), 117 (25), 110 (18).

3α-Acetyl-Dihydrovindolin-Ether

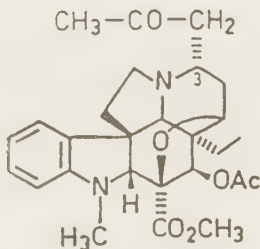


CAS dunkelviolett

DC LM A: R_f 0,3; LM D: R_f 0,2

EI-MS m/z (rel. Int.%): 512 (M⁺, 32), 353 (16), 295 (4), 228 (3), 188 (100), 174 (14), 157 (4), 145 (5), 131 (3), 121 (8), 108 (3).

3α-Acetyl-Dihydrovindorosin-Ether *

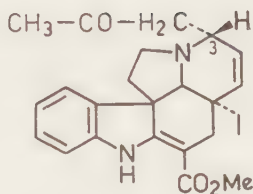


CAS rot

DC LM A: R_f 0,4

EI-MS m/z (rel. Int.%): 482 (M⁺, 2), 423 (5), 323 (16), 265 (5), 168 (100), 167 (23), 144 (32), 143 (30), 121 (9), 115 (8), 106 (6).

3 α -Acetonyl-Tabersonin *



CAS blau

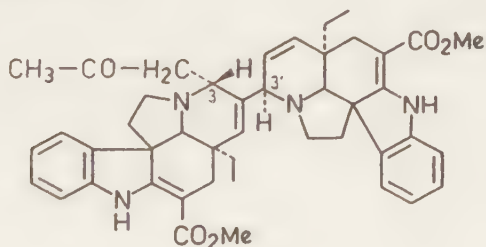
DC LM A: R_f 0,6; LM B: R_f 0,4

UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 329 (4,15), 300 (4,00), 223 (4,03) nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 392 (M^+ , 2), 361 (1), 349 (1), 335 (31), 279 (23), 228 (42), 196 (8), 168 (63), 167 (100), 166 (21).

^1H -NMR (Aceton- D_6): 9,4 ppm (s, NH); 7,24 ppm (d, $J = 7,5$ Hz, H-9); 7,13 ppm (dd, $J_1 = J_2 = 7,5$ Hz, H-11); 7,03 ppm (d, $J = 7,5$ Hz, H-12); 6,86 ppm (dd, $J_1 = J_2 = 7,5$ Hz, H-10); 5,88 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, H-14); 5,76 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, H-15); 3,99 ppm (m, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 6,2$ Hz, $J_3 = 4,5$ Hz, $J_4 = 1,3$ Hz, H-3 β); 3,70 ppm (s, $COOCH_3$); 3,1 ppm (m, H-5); 3,09 ppm (br s, H-21); 2,98 ppm (m, H-5); 2,85 ppm (m, CH_2CO); 2,66 ppm (dd, $J_1 = 15,8$ Hz, $J_2 = 6,2$ Hz, CH_2CO); 2,58 ppm (dd, $J_1 = 15,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-17 α); 2,22 ppm (s, CH_3CO); 2,18 ppm (d, $J = 15,4$ Hz, H-17 β); 2,0 ppm (m, H-6 β); 1,89 ppm (m, H-6 α); 1,05 - 0,85 ppm (m, 2H-19); 0,67 ppm (t, $J = 7,5$ Hz, H-18).

3 α -Acetonyl-Voafrin A *



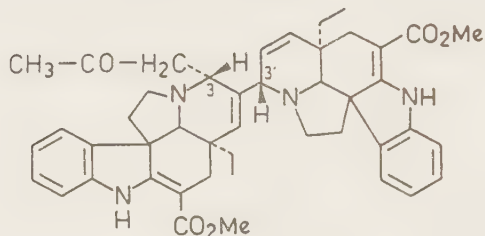
CAS blau

DC LM A: R_f 0,5; LM B: R_f 0,2

UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 328 (4,34), 300 (4,20), 226 (4,29) nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 683 ($M^+ - COCH_3$, 4), 668 (5), 456 (9), 455 (9), 349 (7), 335 (10), 334 (9), 228 (65), 214 (15), 213 (4), 196 (22), 195 (20), 194 (19), 182 (14), 181 (14), 170 (22), 169 (55), 168 (100), 167 (89), 166 (37), 154 (30).

3 α -Acetonyl-Voafrin B *



CAS blau

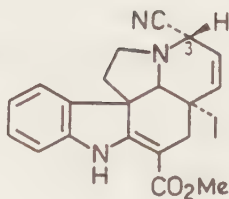
DC LM A: R_f 0,4; LM B: R_f 0,1; LM C: R_f 0,3

UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 328 (4,38), 300 (4,25), 222 (4,34) nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 683 ($M^+ - COCH_3$, 5), 668 (8), 456 (10), 455 (10), 349 (10), 335 (15), 334 (15), 228 (71), 214 (15), 213 (15), 196 (20), 195 (25), 194 (20), 182 (15), 181 (15), 169 (25), 168 (93), 167 (100), 166 (45), 154 (25).

^1H -NMR (Aceton- D_6): 9,5 - 9,4 ppm (2x s, 2x NH), 7,39 ppm (2x d, $J = 7,4$ Hz, H-9,9'); 7,13 ppm (2x dd, $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz, H-11,11'); 7,05 - 7,0 ppm (2x d, $J = 7,4$ Hz, H-12,12'); 6,96 - 6,85 ppm (2 x dd, $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz, H-10,10'); 6,07 ppm (dd, $J_1 = 10,4$ Hz, $J_2 = 1,1$ Hz, H-15'); 5,88 ppm (dd, $J_1 = 10,4$ Hz, $J_2 = 4,8$ Hz, H-14'); 5,66 ppm (br s, H-15); 4,70 ppm (dd, $J_1 = 10,9$ Hz, $J_2 = 3,9$ Hz, H-3 β); 4,03 ppm (br d, $J = 4,8$ Hz, H-3'); 3,7, 3,65 ppm (2x COOCH₃); 3,15 ppm (br d, $J = 1,2$ Hz, H-21); 3,09 ppm (br d, $J = 1,2$ Hz, H-21'); 2,35 ppm (s, CH₃CO); 1,1 - 0,8 ppm (m, H-19,19'); 0,76, 0,69 ppm (2x t, $J = 7,4$ Hz, H-18,18').

3 α -Cyano-Tabersonin



CAS blau

DC LM B: R_f 0,4; LM C: R_f 0,5

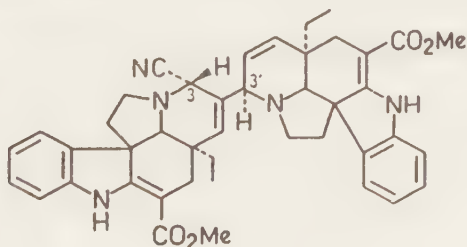
UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 328 (4,18), 295 (4,12), 247 (4,52) nm.

$[\alpha]_D = -354^\circ$ (c = 0,6, MeOH).

EI-MS m/z (rel. Int.%): 361 (M⁺, 32), 360 (22), 334 (7), 302 (5), 229 (52), 228 (32), 214 (37), 201 (42), 168 (75), 167 (68), 160 (100), 159 (47), 144 (73).

¹H-NMR (DMSO-D₆): 9,7 ppm (s, NH); 7,2-6,9 ppm (H-9,10,11,12); 5,95 ppm (dd, J₁ = 9,7 Hz, J₂ = 1,5 Hz, H-15); 5,86 ppm (dd, J₁ = 9,7 Hz, J₂ = 4,8 Hz, H-14); 4,82 ppm (dd, J₁ = 4,8 Hz, J₂ = 1,5 Hz, H-3); 3,7 ppm (s, COOCH₃); 3,06 ppm (m, H-5 α); 2,85 ppm (d, J = 1,4 Hz, H-21); 2,79 ppm (m, H-5 β); 2,49 ppm (dd, J₁ = 14,9 Hz, J₂ = 1,4 Hz, H-17 α); 2,25 ppm (d, J = 14,9 Hz, H-17 β); 1,91 ppm (m, H-6 β); 1,68 ppm (m, H-6 α); 0,92 ppm (m, H-19 α); 0,78 ppm (m, H-19 β); 0,59 ppm (t, J = 7,3 Hz, H-18).

3- α -Cyano-Voafrin A *



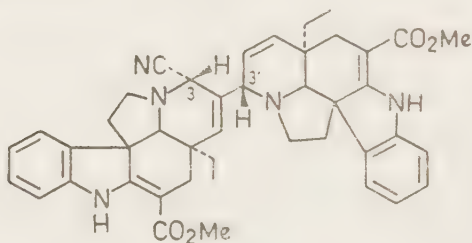
CAS blau

DC LM C: R_f 0,4

EI-MS m/z (rel.Int.%): 695 (M^+ , 28), 669 (11), 668 (11), 440 (9), 335 (36), 229 (45), 228 (86), 227 (26), 214 (19), 213 (16), 196 (28), 195 (18), 194 (16), 182 (13), 169 (34), 168 (100), 167 (54), 154 (25), 147 (15), 135 (26), 122 (17), 121 (18), 108 (21), 107 (100), 106 (25).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6): 6,03 ppm (br s, H-15); 5,85 ppm (dd, $J_1 = 9,7$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, H-15); 5,64 ppm (dd, $J_1 = 9,7$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-14); 4,74 (br s, H-3 β); 3,94 ppm (br s, H-3' α).

3- α -Cyano-Voafrin B *

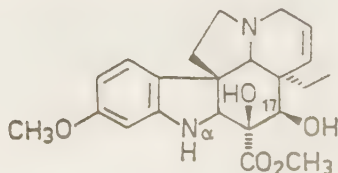


CAS blau

DC LM C: R_f 0,3

EI-MS m/z (rel.Int.%): 695 (M^+ , 12), 668 (10), 361 (5), 347 (6), 335 (20), 229 (34), 228 (60), 227 (22), 214 (49), 203 (14), 202 (34), 201 (21), 200 (22), 197 (30), 196 (30), 195 (30), 194 (19), 172 (26), 169 (36), 168 (100), 167 (72), 166 (28), 155 (17), 154 (43), 153 (19), 149 (26), 147 (17), 135 (59), 134 (39), 127 (29), 123 (29), 122 (47), 121 (47), 108 (59), 107 (59).

17-O-Deacetyl- N_α -Demethyl-Vindolin *



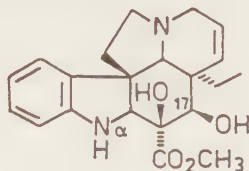
CAS orange

DC LM E: R_f 0,4

UV (MeOH) λ_{max} : 301, 245, 209 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 400 (M⁺, 2), 353 (8), 295 (5), 282 (21), 202 (8), 188 (100), 175 (65), 160 (26), 147 (20), 135 (60), 121 (48), 107 (13).

17-O-Deacetyl-N_α-Demethyl-Vindorosin *



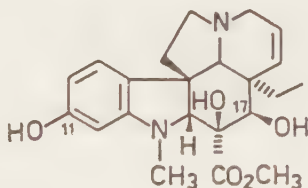
CAS gelborange

DC LM E: R_f 0,4

UV (MeOH) λ_{max}: 303, 247, 206 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 370 (M⁺, 2), 311 (2), 252 (33), 240 (8), 172 (9), 144 (57), 135 (100), 121 (44), 107 (7).

17-O-Deacetyl-11-O-Demethyl-Vindolin *



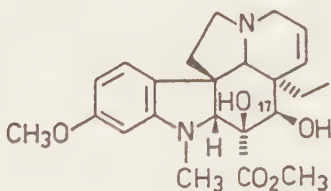
CAS violett

DC LM A: R_f 0,1; LM E: R_f 0,3

UV (MeOH) λ_{max}: 300, 249, 211 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 400 (M⁺, 4), 284 (10), 240 (65), 202 (30), 174 (100), 160 (60), 152 (15), 147 (45), 135 (96), 121 (57), 107 (33).

17-O-Deacetyl-Vindolin



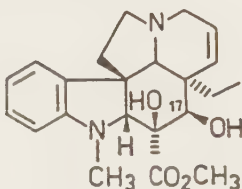
CAS violett

DC LM A: R_f 0,25; LM D: R_f 0,6

UV (MeOH) λ_{max}: 305, 252, 227 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 414 (M⁺, 10), 298 (18), 240 (85), 216 (23), 188 (79), 174 (49), 161 (23), 135 (100), 121 (67), 107 (44).

17-O-Deacetyl-Vindorosin



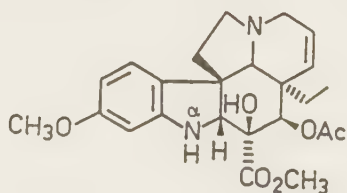
CAS rosa

DC LM A: R_f 0,25; LM D: R_f 0,4

UV (MeOH) λ_{max}: 306, 252, 218 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 384 (M⁺, 11), 325 (2), 268 (17), 240 (64), 186 (34), 158 (96), 144 (45), 135 (100), 121 (52), 107 (43).

N_α-Demethyl-Vindolin



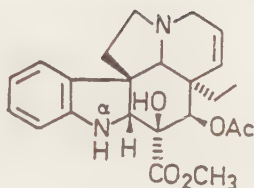
CAS orange

DC LM A: R_f 0,25; LM D: R_f 0,4; LM E: R_f 0,6; LM G: R_f 0,65

UV (MeOH) λ_{max}: 303, 249, 205 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 442 (M⁺, 3), 383 (2), 282 (32), 175 (65), 174 (56), 160 (21), 147 (19), 141 (19), 135 (100), 121 (96), 107 (29).

N_α-Demethyl-Vindorosin *



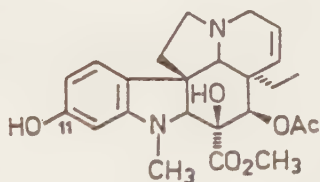
CAS gelbbraun

DC LM A: R_f 0,25; LM D: R_f 0,4

UV (MeOH) λ_{max}: 300, 249, 204 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 412 (M⁺, 2), 285 (5), 252 (29), 226 (47), 190 (15), 167 (8), 144 (42), 135 (100), 121 (52), 107 (17).

11-O-Demethyl-Vindolin



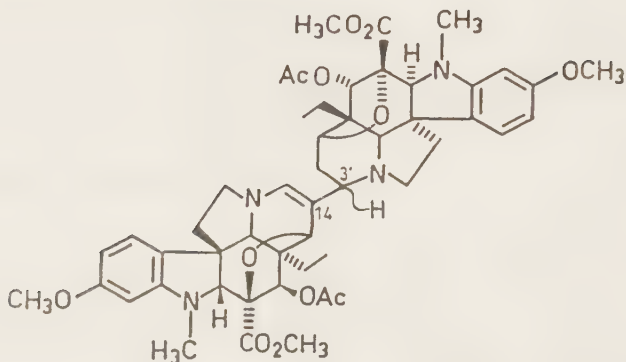
CAS violett

DC LM A: R_f 0,3; LM E: R_f 0,5

UV (MeOH) λ_{max}: 300, 249, 208 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 442 (M⁺, 2), 383 (1), 282 (32), 222 (7), 174 (56), 160 (21), 147 (21), 135 (100), 121 (52), 107 (26).

14,3'-Dihydrovindolin-Ether-Dimeres 1



CAS violett

DC LM A: R_f 0,5.

EI-MS m/z (rel.Int.%): 908 (M⁺, 6), 879 (20), 878 (20),
 849 (13), 749 (8), 661 (11), 602 (10), 502 (12),
 467 (11), 454 (13), 441 (22), 395 (15), 295 (87),
 275 (22), 189 (70), 188 (100), 187 (95), 186 (33),
 175 (33), 174 (100), 173 (59), 172 (33), 159 (24),
 145 (25), 135 (33), 131 (30), 123 (35), 121 (30),
 111 (60), 109 (50).

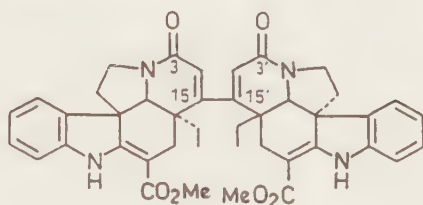
14,3'-Dihydrovindolin-Ether-Dimeres 2

CAS violett

DC LM A: R_f 0,2.

EI-MS m/z (rel.Int.%): 908 (M⁺, 7), 879 (19), 878 (15),
 849 (11), 749 (10), 661 (15), 502 (11), 467 (10),
 454 (6), 441 (19), 395 (7), 369 (9), 345 (15), 295 (44),
 283 (13), 221 (30), 209 (13), 197 (30), 189 (37),
 188 (100), 187 (61), 174 (52), 173 (26), 161 (13),
 159 (16), 147 (26), 135 (67), 133 (22), 121 (15),
 111 (20), 109 (17).

3,3'-Dioxo-15,15'-Ditabersonin *



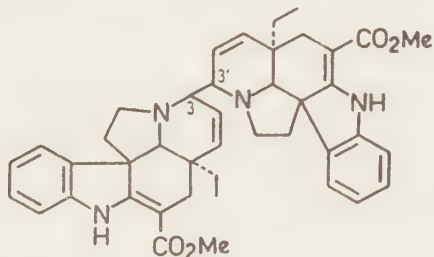
CAS blau

DC LM C (2x entwickelt): R_f 0,6 LM I: R_f 0,4

EI-MS m/z (rel. Int.%): 698 (M⁺, 3), 684 (4), 666 (6), 456 (7), 440 (7), 335 (22), 334 (13), 239 (16), 229 (42), 228 (80), 227 (48), 226 (20), 225 (19), 214 (22), 213 (34), 212 (16), 197 (13), 196 (27), 195 (25), 194 (30), 193 (32), 192 (12), 182 (16), 170 (20), 169 (33), 168 (100), 167 (74), 166 (32), 165 (22), 154 (24), 142 (15), 141 (16), 140 (11), 139 (14), 138 (15), 127 (12), 121 (11), 115 (13), 108 (18).

¹H-NMR (DMSO-D₆ mit 5% (v/v) D₂O): 5,78 ppm (s, H-14,14').

3,3'-Ditabersonin *



CAS blau

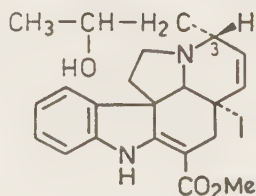
DC LM C (2x entwickelt): R_f 0,8 LM I: R_f 0,5

EI-MS m/z (rel. Int.%): 670 (M⁺, 1), 440 (1), 335 (100), 334 (37), 228 (90), 227 (24), 196 (21), 169 (20), 168 (94), 167 (46), 154 (6), 141 (6), 121 (14), 108 (13).

¹H-NMR (DMSO-D₆): 5,73 ppm (d, J= 10,3 Hz, H-14,14'); 5,70 ppm (d, J= 10,3 Hz, H-15,15').

^{13}C -NMR (DMSO- D_6): 7,17 ppm (C-18); 25,81 ppm (C-17); 28,42 ppm (C-19); 40,63 ppm (C-20); 45,30 ppm (C-6); 46,81 ppm (C-5); 50,65 ppm (C-23); 54,73 ppm (C-7); 60,65 ppm (C-3); 70,22 ppm (C-21); 90,44 ppm (C-16); 110,06 ppm (C-12); 120,10 ppm (C-10); 121,04 ppm (C-9); 126,51 ppm (C-14); 127,52 ppm (C-11); 133,19 ppm (C-15); 137,38 ppm (C-8); 143,55 ppm (C-13); 166,12 ppm (C-2); 167,13 ppm (C-22).
Vgl. Tabersonin: 7,25 ppm (C-18); 26,38 ppm (C-17); 28,49 ppm (C-19); 40,67 ppm (C-20); 44,80 ppm (C-6); 49,81 ppm (C-3); 50,02 ppm (C-5); 50,64 ppm (C-23); 55,02 ppm (C-7); 69,50 ppm (C-21); 90,43 ppm (C-16); 110,00 ppm (C-12); 120,15 ppm (C-10); 121,14 ppm (C-9); 125,33 ppm (C-14); 127,51 ppm (C-11); 132,38 ppm (C-15); 137,61 ppm (C-8); 143,56 ppm (C-13); 165,50 ppm (C-2); 167,16 ppm (C-22).

3 α -(2-Hydroxy-propyl)-Tabersonin 1 *



CAS blau

DC LM A: R_f 0,65 (3 x entwickelt)

EI-MS m/z (rel. Int.%): 394 (M^+ , 9), 336 (27), 335 (92), 229 (20), 228 (100), 227 (11), 196 (15), 169 (14), 168 (58), 167 (26), 154 (10), 141 (6), 121 (15), 108 (10).

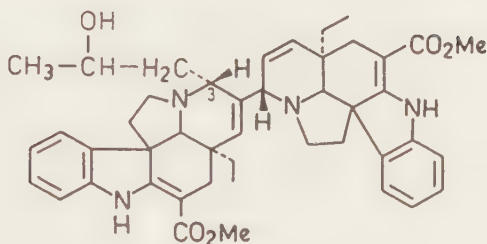
3 α -(2-Hydroxy-propyl)-Tabersonin 2 *

CAS blau

DC LM A: R_f 0,5 (3 x entwickelt)

EI-MS m/z (rel. Int.%): 394 (M^+ , 8), 336 (25), 335 (84), 229 (20), 228 (100), 227 (11), 196 (15), 169 (14), 168 (59), 167 (26), 154 (10), 141 (6), 121 (15), 108 (9).

3 α -(2-Hydroxy-propyl)-Voafrin B *



CAS blau

DC LM C: R_f 0,2

EI-MS m/z (rel. Int.%): 728 (M⁺, 4), 669 (4), 336 (8), 335 (21), 229 (18), 228 (68), 213 (6), 196 (22), 169 (26), 168 (100), 167 (28), 141 (10), 122 (10), 121 (14), 115 (7), 108 (11).

Vor Reduktion von 3 α -Acetonyl-Voafrin B:

EI-MS m/z (rel. Int.%): 726 (M⁺, 3), 669 (3), 336 (9), 335 (28), 229 (25), 228 (71), 227 (10), 213 (12), 196 (25), 170 (16), 169 (31), 168 (100), 167 (33), 154 (16), 141 (10), 121 (10), 108 (9).

Hydroxyl-Tabersonin 1 (aus Ceruloplasmin-Oxidation).

CAS blau

DC LM C: R_f 0,6.

EI-MS m/z (rel.Int.%): 352 (M⁺, 60), 335 (32), 323 (15), 293 (21), 251 (47), 229 (24), 228 (32), 215 (42), 214 (100), 196 (21), 182 (42), 168 (37), 167 (34), 154 (79), 144 (63), 143 (50), 127 (32), 121 (24), 115 (26), 111 (37), 109 (32).

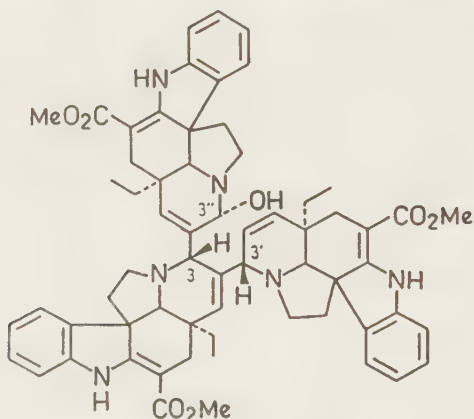
Hydroxyl-Tabersonin 2 (aus Peroxidase/DDQ-Oxidation).

CAS blau

DC LM C: R_f 0,1.

EI-MS m/z (rel.Int.%): 352 (M⁺, 9), 323 (4), 249 (8), 227 (62), 228 (16), 196 (18), 195 (100), 194 (20), 168 (36), 167 (49), 166 (16), 154 (22), 149 (10), 135 (18), 127 (16), 121 (12), 115 (11), 111 (13).

3'' α -Hydroxy-3 α -(14''-Tabersonyl)-Voafrin B *



CAS blau

DC LM C: R_f 0,1; LM M: R_f 0,5.

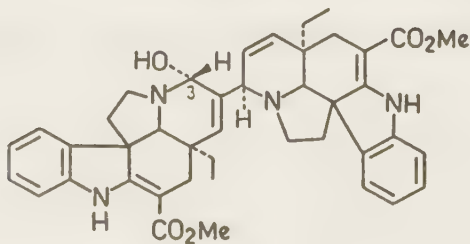
UV (MeOH) $\lambda_{\max}$: 328, 289 nm.

EI-MS m/z (rel. int. %): 769 (7), 543 (6), 335 (9), 328 (11), 229 (56), 224 (18), 170 (100), 169 (74), 168 (93), 154 (59), 143 (30).

¹H-NMR (DMSO-D₆): 5,47 ppm (d, J= 6,8 Hz, OH-3'' α); 5,36 ppm (br s, H-15''); 5,30 ppm (d, J= 6,6 Hz, H-3'' β).

¹H-NMR (DMSO-D₆ mit 5% (v/v) D₂O): 5,34 ppm (br s, H-15''); 5,30 ppm (br s, H-3'' β).

3 α -Hydroxy-Voafrin A *



CAS blau

DC LM B: R_f 0,3; LM C: R_f 0,45; LM H: R_f 0,4.

UV (MeOH) λ_{max} (ε): 328 (4,48), 300 (4,35), 226 (4,35) nm.

[α]_D : -21° ± 5° (c = 0,4, MeOH).

EI-MS m/z (rel. Int.%): 669 (M⁺ - OH, 15), 668 (18), 442 (9), 347 (31), 335 (19), 228 (58), 213 (15), 194 (42), 182 (21), 168 (100), 167 (83), 154 (19).

Reduktion mit NaBH₄:

EI-MS m/z (rel. Int.%): 671 (M⁺+1, 2), 670 (M⁺, 3), 442 (1), 500 (1), 457 (3), 443 (4), 442 (6), 441 (4), 429 (2), 428 (4), 418 (3), 350 (3), 349 (6), 336 (4), 335 (7), 230 (6), 229 (20), 228 (40), 214 (10), 197 (18), 196 (18), 169 (45), 168 (100), 167 (42), 154 (29), 135 (16), 122 (13), 115 (10), 108 (8).

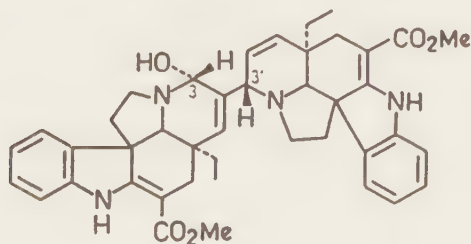
¹H-NMR (Aceton-D₆): 3,59 ppm (br d, J = 15,6 Hz, H-3β); 3,12 ppm (dd, J₁ = 15,6 Hz, J₂ = 2,0 Hz, H-3α).

Reduktion mit NaBD₄:

EI-MS m/z (rel. Int.%); Fragmente mit Deuteriumeinbau unterstrichen: 672 (M⁺+1,7), 671 (M⁺, 7), 458 (7), 444 (6), 443 (6), 429 (7), 428 (5), 418 (7), 351 (15), 350 (13), 336 (18), 335 (11), 229 (34), 228 (86), 214 (10), 196 (24), 169 (42), 168 (100), 167 (32), 154 (22), 136 (7), 135 (6), 123 (15), 115 (15), 109 (8), 108 (9).

¹H-NMR (Aceton-D₆): 3,57 ppm (br s, H-3β).

3α-Hydroxy-Voafrin B *



CAS blau

DC LM A: R_f 0,35; LM B: R_f 0,4; LM H: R_f 0,3.

$[\alpha]_D$: $-68 \pm 5^\circ$ ($c = 0,45$, MeOH).

UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 328 (4,15), 300 (4,0), 226 (3,97) nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 669 ($M^+ - OH$, 6), 668 (7), 439 (5), 410 (2), 347 (21), 335 (17), 229 (42), 228 (41), 213 (57), 168 (100), 167 (79), 154 (41).

^1H -NMR (DMSO- D_6 mit 5% (v/v) D_2O): 7,29 ppm, 7,22 ppm (H-9',9'); 7,10 ppm (H-10',10'); 5,91 ppm (d, $J = 10,2$ Hz, H-15'); 5,74 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 4,6$ Hz, H-14'); 5,46 ppm (s, H-15); 5,22 ppm (s, H-3 β); 4,10 ppm (d, $J = 4,6$ Hz, H-3'); 3,67 ppm, 3,62 ppm (2x s, 2x $COOCH_3$); 3,30 ppm (br s, H-21); 3,1 - 2,9 ppm (m, 2H-5), 2H-5'); 2,91 ppm (br s, H-21'); 2,57 ppm (dd, $J_1 = 14,7$ Hz, $J_2 = 1,0$ Hz, H-17'a); 2,25 ppm (dd, $J_1 = 14,7$ Hz, $J_2 = 1,0$ Hz, H-17'a); 2,14 ppm (d, $J = 14,7$ Hz, H-17 β); 2,07 ppm (d, $J = 14,7$ Hz, H-17' β); 1,94 - 1,5 ppm (m, 2H-6), 2H-6'); 1,0 - 0,7 ppm (m, 2H-19), 2H-19'); 0,65 ppm (t, $J = 7,5$ Hz, 3H-18'); 0,53 ppm (t, $J = 7,5$ Hz, 3H-18).

^1H -NMR (DMSO- D_6): 5,53 ppm, 5,48 ppm (2x s, H-15); 5,40 ppm (d, $J = 5,7$ Hz, OH-3a); 5,24 ppm (d, $J = 5,7$ Hz, H-3 β); 4,93 ppm (s, H-3a).

^1H -NMR (Aceton- D_6 , mit 5% (v/v) D_2O): 7,4-7,3 ppm (2x d, $J = 7,4$ Hz, H-9',9'); 7,15 - 7,08 ppm (2x dd, $J_1 = J_2 = 7,4$ Hz, H-11,11'); 7,05 - 7,0 ppm (2x d, $J = 7,4$ Hz, H-12,12'); 6,9 - 6,8 ppm (2x dd, $J = 7,4$ Hz, H-10,10'); 5,95 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, H-15'); 5,77 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 4,7$ Hz, H-14'); 5,60 ppm (br s, H-15); 5,42 (br s, H-3); 4,23 ppm (d, $J = 4,7$ Hz, H-3'); 3,7 - 3,6 ppm (2x s, 2x $COOCH_3$); 3,47 ppm (d, $J = 1,4$ Hz, H-21); 3,4 - 3,0 ppm (m, H-5,5'); 3,1 ppm (d, $J = 1,4$ Hz, H-21'); 2,66 ppm (dd, $J_1 = 15,1$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-17'a); 2,39 ppm (dd, $J_1 = 14,8$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-17'a); 2,30 ppm (d, $J = 14,8$ Hz, H-17 β); 2,15 ppm (d, $J = 15,1$ Hz, H-17' β); 2,0 - 1,7 ppm (m, H-6,6'); 1,1 - 0,8 ppm (m, H-19,19'); 0,7 - 0,6 ppm (2x t, $J = 7,4$ Hz, H-18,18').

^1H -NMR (Aceton- D_6): 5,65 ppm, 5,62 ppm (2x s, H-15); 5,44 ppm (br s, H-3 β); 5,07 ppm (s, H-3a); 4,3 - 4,1 ppm (2x d, $J = 4,7$ Hz, H-3').

^{13}C -NMR (DMSO- D_6 mit 5% (v/v) D_2O): 77,2 ppm (C-3, α -OH); 55,7 ppm (C-3'); 60,8 ppm (C-21'); 64,6 ppm (C-21).
Vgl. Voafrin B: 52,9 ppm (C-3); 59,7 ppm (C-3'); 66,0 ppm (C-21'); 71,0 ppm (C-21).

^{13}C -NMR (DMSO- D_6): 77,2 ppm (C-3, α -OH); 85,5 ppm (C-3, β -OH).
Vgl. Voafrin B: 52,9 ppm (C-3).

Reduktion mit NaBH_4 :

EI-MS m/z (rel. Int.%): 671 ($M^+ + 1$, 2), 670 (M^+ , 2), 642 (1), 500 (2), 457 (3), 442 (5), 428 (3), 418 (3), 349 (6), 336 (4), 335 (7), 240 ((7), 229 (29), 228 (43), 227 (20), 213 (26), 197 (16), 196 (16), 170 (35), 169 (50), 168 (100), 167 (40), 154 (30), 135 (10), 122 (11), 115 (14), 108 (8).

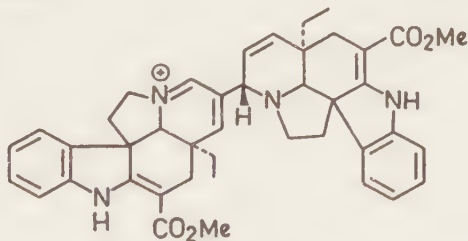
$^1\text{H-NMR}$ (Aceton- D_6): 3,83 ppm (br d, $J = 15,4$ Hz, H-3 β), 3,34 ppm (dd, $J_1 = 15,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3 α).

Reduktion mit NaBD_4 :

EI-MS m/z (rel. Int.%); Fragmente mit Deuteriumeinbau unterstrichen: 672 ($M^+ + 1$, 3), 671 (M^+ , 3), 501 (2), 458 (5), 443 (5), 429 (4), 428 (4), 418 (7), 351 (20), 350 (14), 337 (8), 336 (11), 335 (10), 229 (33), 228 (79), 196 (22), 170 (16), 169 (32), 168 (100), 167 (34), 154 (19), 136 (4), 135 (5), 123 (11), 122 (12), 115 (6), 109 (8), 108 (8).

$^1\text{H-NMR}$ (Aceton- D_6): 3,81 ppm (br s, H-3 β).

Iminium-Voafrin B *



$^1\text{H-NMR}$ (Aceton- D_6 + Trifluoressigsäure): 9,7 - 9,6 ppm (2x s, 2x NH); 9,48 ppm (br s, H-3); 7,6 - 6,9 ppm (H-9-12,9'-12'); 7,34 ppm (s, H-15); 6,42 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, H-15'); 6,12 ppm (dd, $J_1 = 10,2$ Hz, $J_2 = 3,7$ Hz, H-14'); 5,01 ppm (m, H-3'); 4,90 ppm (br s, H-21); 4,79 ppm (dd, $J_1 = 13,2$ Hz, $J_2 = 6,5$ Hz, H-5 α); 4,67 ppm (m, H-5 β); 3,75 ppm (s, H-21'); 3,7 ppm (2x s, 2x COOCH_3); 3,6 ppm (m, 2H-5'); 2,8 ppm (2x dd, $J_1 = 16$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-17 α , 17 α'); 2,5 - 2,1 ppm (m, H-6,6'); 2,3 ppm (2x d, $J = 16$ Hz, H-17 β , 17 β'); 1,2 - 1,0 ppm (m, H-19,19'); 0,8 - 0,7 ppm (2x t, $J = 7,3$ Hz, H-18,18').

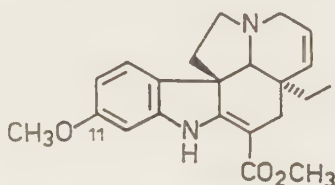
Hydroxyl-Voafrin (aus Ceruloplasmin-Oxidation)

CAS blau

DC LM C: R_f 0,2

EI-MS m/z (rel.Int.%): 686 (M⁺, 6), 670 (28), 628 (12),
349 (18), 335 (8), 332 (24), 229 (43), 228 (74),
227 (28), 220 (22), 214 (15), 196 (30), 169 (16),
168 (100), 167 (37), 154 (36), 149 (26), 135 (18),
129 (22), 122 (25), 121 (26), 111 (34), 109 (33).

11-Methoxy-Tabersonin

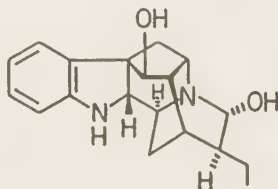


CAS blau

DC LM A: R_f 0,6; LM: B R_f 0,4

EI-MS m/z (rel. Int.%): 366 (M⁺, 66), 365 (58), 259 (74),
258 (48), 244 (17), 200 (24), 183 (14), 167 (10),
153 (17), 135 (100), 134 (29), 122 (34), 121 (42),
107 (48).

Norajmalin



CAS orange

DC LM A: R_f 0,15.

UV (MeOH) λ_{max}: 286, 238 nm.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 312 (M⁺, 47), 297 (14), 283 (10),
186 (45), 182 (87), 169 (89), 168 (100), 156 (47),
143 (53), 130 (81), 117 (49), 110 (62).

Oxo-Ditabersonin 1 (aus photochemischem Ansatz)

CAS blau

DC LM C (2x entwickelt): R_f 0,7; LM I: R_f 0,45

EI-MS m/z (rel.Int.%): 684 (M^+ , 7), 445 (5), 336 (20), 335 (63), 334 (45), 229 (35), 228 (99), 227 (40), 214 (8), 196 (25), 195 (14), 169 (26), 168 (100), 167 (50), 166 (13), 154 (13), 141 (7), 121 (12), 115 (4), 108 (8).

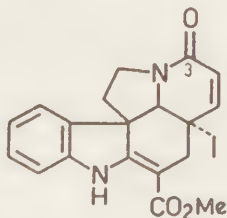
Oxo-Ditabersonin 2 (aus photochemischem Ansatz)

CAS blau

DC LM C (2x entwickelt): R_f 0,55; LM I: R_f 0,3

EI-MS m/z (rel.Int.%): 684 (M^+ , 8), 670 (14), 669 (19), 668 (34), 667 (27), 666 (13), 442 (11), 347 (27), 346 (14), 335 (22), 334 (21), 229 (29), 228 (71), 227 (42), 226 (28), 225 (15), 214 (18), 213 (17), 200 (13), 196 (27), 195 (27), 194 (56), 193 (25), 182 (24), 181 (14), 169 (30), 168 (100), 167 (91), 166 (42), 165 (14), 154 (22), 141 (10), 122 (14), 121 (18), 115 (9), 108 (15).

3-Oxo-Tabersonin



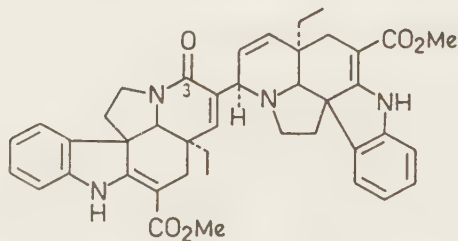
CAS blau

DC LM C (2x entwickelt): R_f 0,2; LM J: R_f 0,5; LM M: R_f 0,2.

EI-MS m/z (rel. Int.%): 350 (M^+ , 6), 319 (1), 275 (2), 228 (12), 227 (82), 226 (16), 214 (5), 196 (9), 195 (100), 194 (21), 182 (5), 169 (9), 168 (34), 167 (48), 166 (16), 154 (16), 140 (6), 128 (6), 127 (9), 115 (6), 107 (7).

¹H-NMR (DMSO-D₆): 9,9 ppm (s, NH); 7,4 - 6,9 ppm (H-9,10,11,12); 6,57 ppm (d, J= 10,0 Hz, H-15); 5,83 ppm (d, J= 10,0 Hz, H-14); 4,08 ppm (m, H-5α); 3,98 ppm (br s, (H-21); 3,70 ppm (s, CO₂CH₃); 3,3 ppm (m, H-5β); 2,53 ppm (dd, J₁= 15,7 Hz, J₂= 1,7 Hz, H-17α); 1,97 ppm (d, J= 15,7 Hz, H-17β); 1,89 ppm (m, H-6β); 1,69 ppm (m, H-6α); 0,89-0,99 ppm (2x m, 2H-19); 0,79 ppm (t, J= 7,1 Hz, H-18).

3-Oxo-Voafrin A *



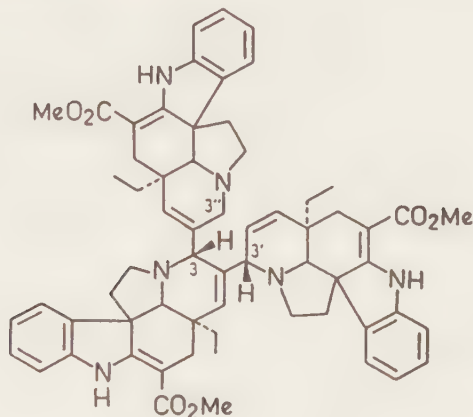
CAS blau

DC LM M: R_f 0,4

EI-MS m/z (rel. Int.%): 684 (M⁺, 3), 456 (10), 355 (3), 354 (5), 229 (23), 228 (15), 214 (5), 196 (8), 195 (9), 169 (14), 168 (33), 167 (19), 154 (15), 141 (26), 140 (100), 139 (14), 135 (7), 127 (12), 121 (10), 111 (14), 110 (18), 109 (13), 108 (16).

¹H-NMR (DMSO-D₆): 6,44 ppm (s, H-15); 4,62 ppm (d, J= 2,5 Hz, H-3'α); 4,19 ppm (m, H-5α); 3,96 ppm (br s, H-21).

¹³C-NMR (DMSO-D₆): 160,77 ppm (C-3).



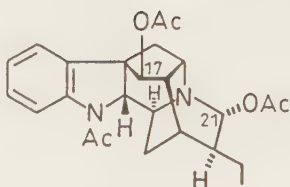
DC LM C: R_f 0,2; LM M R_f 0,6.

$$[\alpha]_D: -169^\circ \quad (c = 0.34, \text{ MeOH}).$$

EI-MS m/z (rel.Int.%): 775 (M⁺, -229, 4), 546 (3), 440 (4),
 335 (7), 318 (4), 230 (18), 229 (60), 228 (26), 214 (22),
 198 (14), 197 (24), 196 (16), 182 (10), 171 (33),
 170 (100), 169 (78), 168 (93), 167 (35), 156 (26),
 155 (43), 154 (60), 133 (24), 128 (37), 115 (56).

¹H-NMR (DMSO-D₆): 9,9 - 9,7 ppm (3x s, 3x NH); 7,4 - 6,8 ppm (H-9-12,9'-12',9''-12''); 6,0 ppm (d, J= 10,4 Hz, H-15'); 5,78 ppm (br s, H-15); 5,77 ppm (dd, J₁= 10,3 Hz, J₂= 4,6 Hz, H-14'); 5,45 ppm (br s, H-15''); 4,34 ppm (br s, H-3); 3,90 ppm (d, J= 15,7 Hz, H-3''β); 3,82 ppm (d, J= 4,5 Hz, H-3'); 3,7 - 3,6 ppm (3x s, 3x CO₂CH₃); 3,45 ppm (d, J= 15,6 Hz, H-3''α); 3,2 - 2,9 ppm (6x m, H-5,5',5''); 3,0 - 2,8 ppm (3x br s, H-21,21',21''); 2,6 - 2,5 ppm (3x dd, J₁= 14,9 Hz, J₂< 1 Hz, H-17α,17'α,17''α); 2,2 - 1,9 ppm (3x d, J= 14,9 Hz, H-17β,17'β,17''β); 2,05 - 1,95 ppm (m, H-6,6',6''); 1,1 - 0,8 ppm (m, H-19,19',19''); 0,8 - 0,6 ppm (3x t, J= 7,5 Hz, H-18,18',18'').

Triacetyl-Norajmalin

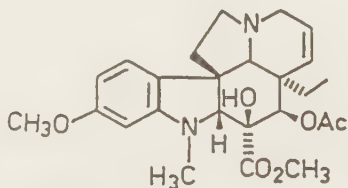


CAS rot, fluoreszierend 360 nm

DC LM A: R_f 0,35

EI-MS m/z (rel. Int.%): 438 (M^+ , 11), 396 (35), 354 (33),
222 (89), 211 (46), 196 (83), 180 (44), 169 (64),
168 (100), 156 (24), 143 (36), 142 (36), 130 (61),
117 (22).

Vindolin



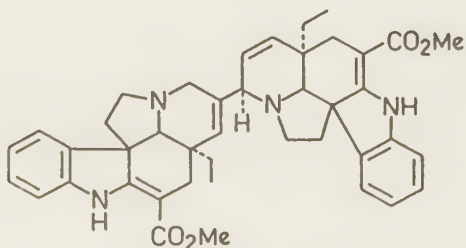
CAS violett

DC LM A: R_f 0,4; LM D: R_f 0,7

UV (MeOH) λ_{max} : 304, 253, 220 nm.

EI-MS m/z (rel.Int%): 456 (M^+ , 5), 397 (2), 295 (17),
282 (10), 222 (8), 189 (75), 188 (54), 174 (27),
162 (26), 135 (100), 122 (43), 121 (43), 107 (17).

Voafirin A



CAS blau

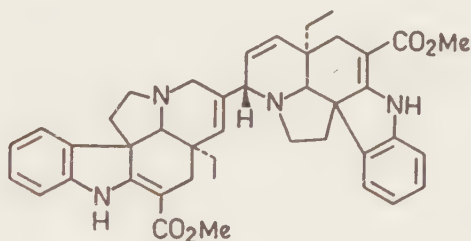
DC LM A: R_f 0,7; LM B: R_f 0,4; LM C: R_f 0,5; LM H: R_f 0,45.

UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 328 (4,54), 298 (4,41), 225 (4,33).

$[\alpha]_D$: -82° (c= 0,49, MeOH).

EI-MS m/z (rel. Int.%): 670 (M⁺, 38), 441 (8), 349 (10), 335 (15), 249 (8), 229 (27), 228 (77), 227 (77), 214 (11), 213 (10), 197 (19), 196 (31), 182 (10), 170 (20), 169 (40), 168 (100), 167 (70), 166 (19), 154 (52), 141 (15), 134 (15), 122 (14), 121 (15), 115 (10), 108 (9).

Voafrin B



CAS blau

DC LM A: R_f 0,65; LM B: R_f 0,3; LM C: R_f 0,4; LM H: R_f 0,4.

UV (MeOH) λ_{max} (ϵ): 328 (4,50), 300 (4,35), 225 (4,33).

$[\alpha]_D$: -276° (c= 0,74, MeOH).

EI-MS m/z (rel. Int.%): 670 (M⁺, 30), 441 (12), 349 (10), 335 (8), 249 (5), 229 (23), 228 (44), 227 (15), 214 (18), 213 (24), 212 (15), 197 (15), 196 (23), 182 (8), 170 (30), 169 (38), 168 (100), 167 (54), 166 (15), 154 (35), 141 (12), 134 (8), 122 (8), 121 (9), 115 (13), 108 (6).

VII. Literaturverzeichnis:

- ACHENBACH H., RAFFELSBERGER B.: 19-Ethoxycoronaridine, a Novel Alkaloid from *Tabernaemontana glandulosa*.
Phytochemistry 19, 716-717 (1980).
- AHLERS J., ARNOLD A., DÖHREN R., PETER H.W.: Enzymkinetik.
G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1982).
- AIMI N., ASADA Y., SAKAI S., HAGINIWA J.: Studies on Plants Containing Indole Alkaloids. VII. Isolation of Several Aspidosperma- and Vincamine-type Alkaloids from the Seeds of *Amsonia elliptica* ROEM. et SCHULT.
Chem. Pharm. Bull. 26, 1182-1187 (1978).
- AMRHEIN N., DEUS B., GERK P., STEINRUECKEN H.: The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate II. Influence of Glyphosate with Chorismate Formation *in vivo* and *in vitro*.
Plant Physiol. 66, 830-834. (1980).
- ANAND N., NITYANAND S.: Integrated Approach to Development of New Drugs from Plants and Indigenous Remedies. In: Natural Products and Drug Development. P. Krogsgaard-Larsen, S.B. Christensen, H. Kofod (eds.), Munksgaard, Copenhagen; Nankodo, Tokyo (1984).
- ANDO M., BÜCHI G., OHNUMA T.: The Total Synthesis of (±)-Vindoline.
J. Am. Chem. Soc. 97, 6880-6881 (1975).
- ANDREWS P.: Estimation of the Molecular Weight of Proteins by Sephadex Gelfiltration.
Biochem. J. 91, 222-233 (1964).
- ANDREWS P.: The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range.
Biochem. J. 96, 595-606 (1965).
- ANDRIAMIALISOA R.Z., LANGLOIS N., LANGLOIS Y.: A New Synthetic Route to Vindorosine.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1118-1119 (1982).
- ANDRIAMIALISOA R.Z., LANGLOIS N., LANGLOIS Y.: A New Efficient Total Synthesis of Vindorosine and Vindoline.
J. Org. Chem. 50, 961-967 (1985).
- APPENROTH K.J., AUGSTEN H.: An Improvement of the Protein Determination in Plant Tissues with the Dye-binding Method According to BRADFORD.
Biochem. Physiol. Pflanzen 182, 85-89 (1987).
- ARENS H., DEUS-NEUMANN B., ZENK M.H.: Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Ajmaline.
Planta medica 53, 179-183 (1987).
- ATKINSON T., HAMMOND P.M., HARTWELL R.D., HUGHES P., SCAWEN M.D., SHERWOOD R.F., SMALL D.A.P., BRUTON C.J., HARVEY M.J., LOWE C.L.: Triazine-dye affinity chromatography.
Biochem. Soc. Transactions 9, 290-293 (1981).

- BALSEVICH J., DELUCA V., KURZ W.G.W.: Altered Alkaloid Pattern in Dark Grown Seedlings of *Catharanthus roseus*. The Isolation and Characterisation of 4-Desacetoxyvindoline: A Novel Indole Alkaloid and Proposed Precursor of Vindoline.
Heterocycles 24, 2415-2421 (1986).
- BANHOLZER R., SCHULZ W., ZEILE K.: (-)-Norscopolamine.
Ger. Offen 1,912,563 (1969);
Chem. Abstr. 72, 12940f.
- BARNETT C.J., CULLINAN G.J., GERZON K., HOYING R.C., JONES W.E., NEWLON W.M., POORE G.A., ROBISON R.L., SWEENEY M.J., TODD G.C., DYKE R.W., NELSON R.L.: Structure-Activity Relationships of Dimeric *Catharanthus* Alkaloids. 1. Deacetylvinblastine Amide (Vindesine) Sulfate.
J. Med Chem. 21, 88-96 (1978).
- BARTLETT M.F., SKLAR R., TAYLOR W.I., SCHLITTLER E., AMAI R.L.S., BEAK P., BRINGI N.V., WENKERT E.: Rauwolfia Alkaloids XXXVIII. Stereospecific Degradation Leading to the Absolute Configuration and Structure of Ajmaline, Sarpagine and Corynantheidine.
J. Am. Chem. Soc. 84, 622-630 (1961).
- BARTON D.H.R., KIRBY G.W., PRAGER R.H., WILSON E.M.: On the Origin of the C-1 Fragment in Indole Alkaloids.
J. Chem. Soc., 3990-3994 (1965).
- BATTERSBY A.R., BROWN R.T., KAPIL R.S., MARTIN J.A., PLUNKETT A.D., TAYLOR J.B.: Biosynthesis of the Indole Alkaloids.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 46-47 (1966 a).
- BATTERSBY A.R., BROWN R.T., KNIGHT J.A., MARTIN J.A., PLUNKETT A.O.: Biosynthesis of the Indole Alkaloids from a Monoterpene.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 346-347 (1966 b).
- BATTERSBY A.R., KAPIL R.S., MARTIN J.A., MO L.: Loganin as Precursor of the Indole Alkaloids.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 133-134 (1968).
- BATTERSBY A.R., BURNETT A.R., PARSONS P.G.: Alkaloid Biosynthesis. Part XIV. Secologanin. Its Conversion into Ipecoside and Its Role as Biological Precursor of the Indole Alkaloids.
J. Chem. Soc. (c), 1187-1192 (1969 a).
- BATTERSBY A.R., HALL E.S.: The Intermediacy of Geissoschizine in Indole Alkaloid Biosynthesis. Rearrangement to the Strychnos Skeleton.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 793-794 (1969 b).
- BATTERSBY A.R., BROWN S.H., PANE T.G.: Biosynthesis of Loganin and the Indole Alkaloids from Hydroxygeraniol-Hydroxynerol.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 827-828 (1970 a).

- BATTERSBY A.R., BURNETT A.R., PARSONS P.G.: Preparation and Isolation of Deoxyloganin: Its Role as Precursor of Logenin and the Indole Alkaloids.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 826-827 (1970 b).
- BATTERSBY A.R., THOMPSON M., GLÜSENKAMP K.-H., TIETZE L.F.: Untersuchungen zur Biogenese der Indolalkaloide. Synthese und Verfütterung radioaktiv markierter Monoterpenaldehyde.
Chem. Ber. 114, 3430-3438 (1981).
- BAUMERT A., HIEKE M., GRÖGER D.: N-Methylation of Anthranilic Acid to N-Methylantranilic Acid by Cell-free Extracts of *Ruta graveolens* Tissue Cultures.
Planta med. 48, 258-262 (1983).
- BELLET P., VANTHUONG T.: N-Demethylated Indole Alkaloids.
Fr. Patent 1,519,524 (1968);
Chem. Abstr. 71, 70786a.
- BELLET P., VANTHUONG T.: Pharmacologically Active 10-Hydroxycorynanthine and 10-Hydroxyajmalicine.
Fr. Patent 2,068,400 (1972);
Chem. Abstr. 77, 32721s.
- BERLIN J., MOLLENSCHOTT C., DICOSMO F.: Comparison of Various Strategies Designed to Optimize Indole Alkaloid Accumulation of a Cell Suspension Culture of *Catharanthus roseus*.
Z. Naturforsch. 42c, 1101-1108 (1987).
- BETTS R.E., WALTERS D.E., ROSAZZA J.P.: Microbial Transformations of Antitumor Compounds. 1. Conversion of Acronycine to 9-Hydroxyacronycine by *Cunninghamella echinulata*.
J. Med. Chem. 17, 599-602 (1974).
- BJELLQVIST B., EK K., RIGHETTI P.G., GIANAZZA E., GÖRG A., WESTERMEIER R.: Isoelectric Focusing in Immobilized pH-Gradients: Principle, Methodology and Some Applications.
J. Biochem. Biophys. Methods 6, 317-339 (1982).
- BLASKO G., MUNGESAN N., FREYER A.J., SHAMMA M., ANSARI A.A., RAHMAN A.U.: Karachine - An Unusual Protoberberine Alkaloid.
J. Am. Chem. Soc. 104, 2039-2041 (1982).
- BOBBITT J.M., MCNEW KIELY J., KHANNA K.L., EBERMANN R.: Synthesis of Isochinolines. III. A New Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolines.
J. Org. Chem. 30, 2247-2250 (1965).
- BODER G.B., GORMAN M., JOHNSON I.S., SIMPSON P.J.: Tissue Culture Studies of *Catharanthus roseus* Crown Gall.
Lloydia 27, 328-333 (1964).
- BONNERJEA J., OH S., HOARE M., DUNNILL P.: Protein Purification: The Right Step at the Right Time.
Bio/Technology 4, 954-958 (1986).

- BOYER P.D.: Sulfhydryl and Bisulfide Groups of Enzymes. In: The Enzymes Vol 1: Kinetics, Thermodynamics, Mechanism, Basic Properties. P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck (eds.), Academic Press, New York (1959).
- BRADFORD M.M.: A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-Binding. Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).
- BREIDENBACH R.W., BEEVERS H.: Association of the Glyoxalate Cycle Enzymes in a Novel Subcellular Particle from Castor Bean Endosperm. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 462-469 (1967).
- BRESLOW R.: Biomimetic Chemistry. Chem. Soc. Rev. 1, 553-580 (1972).
- BROWN R.T., LEONARD J.: Reversible Trapping of Labile 21-Dehydroheteroyohimbines. Tetrahedron Letters 18, 4251-4254 (1977).
- BRUNETON J., BOUQUET A., CAVE E.: Alcaloïdes des Écorces des Racines de *Crioceras dipladeniiflorus*. Phytochemistry 12, 1475-1480 (1973).
- BUI A.M., DAS B.C., POTIER P.: Madagascan Plants. XXI. Chemotaxonomic Study of *Hazunta modesta*. Phytochemistry 19, 1473-1475 (1980).
- CALABI L., DANIELI B., LESMA G., PALMISANO G.: Dye-sensitized Photo-oxygenation of the *Aspidosperma* Alkaloids Vincadifformine and Tabersonine. A New, Convenient Approach to Vincamine. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 1371-1379 (1982).
- CAREW D.P., KRUEGER R.J.: Metabolism of Vindoline, Catharanthine HCl and Vincalkeboblantine Sulfate by Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry 16, 1461-1462 (1977).
- CHIEN M.M., ROSAZZA J.P.: Microbial Transformation of Natural Antitumor Agents. 9. O-Demethylation of 9-Methoxy-ellipticine. J. Nat. Prod. 42, 643-647 (1979).
- CONSTABEL F., RAMBOLD S., LETOURNEAU D., KURZ W.G.W., KUTNEY J.P.: Alkaloid Produktion in *Catharanthus roseus* Cell Cultures. X. Mitotoxic Effect of 3',4'-Dehydrovinblastine. Z. Pflanzenphysiol. 105, 53-58 (1981).
- CONSTABEL F., GAUDET-LA PRAIRIE P., KURZ W.G.W., KUTNEY J.P.: Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures. XII. Biosynthetic Capacity of Callus from Original Explants and Regenerated Shoots. Plant Cell Reports 1, 139-142 (1982).
- CORDELL G.A.: The *Aspidosperma* Alkaloids. In: The Alkaloids. Chemistry and Physiology. Vol XVII. R.H.F. Manske, R.G.A. Rodrigo (eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London (1979).

- CORDELL G.A., SAXTON J.E.: Bisindole Alkaloids. In: The Alkaloids. Chemistry and Physiology. R.G.A. Rodrigo (ed.) Academic Press, New York (1981).
- COURT W.E., IWU M.M.: Chromogenic Reactions of *Rauwolfia* Alkaloids after Separation with Thin Layer Chromatography. *J. Chromatography* 187, 199-207 (1980).
- COURT W.E.: Alkaloid Distribution in Some African *Rauwolfia* Species. *Planta medica* 48, 228-233 (1983).
- CROTEAU R., HOOPER C.L.: Metabolism of Monoterpenes: Acetylation of (-)-Menthyl by a Soluble Enzyme Preparation from Peppermint (*Mentha piperita*) Leaves. *Plant Physiol.* 61, 737-742 (1978).
- CZYGAN F.C.: Biogene Arzneistoffe im Spiegel moderner Forschung. Vortrag auf dem Bayer. Apothekertag Augsburg (1985).
- DANIELI B., LESMA G., PALMISANO G., RIVA R.: Rapid Access to the Highly Oxygenated Aspidosperma Alkaloids Vindoline, Vindorosine, and Cathovaline. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 909-911 (1984).
- DANIELI B., LESMA G., PALMISANO G., RIVA R.: Aspidosperma Alkaloids. Conversion of Tabersonine into Vindoline. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 155-160 (1987).
- DAVIS B.J.: Disk Electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 212, 404-427 (1964).
- DAVIS P.J.: Natural and Semi Synthetic Alkaloids. In: *Biotechnology 6a*. K. Kieslich (ed.) Verlag Chemie Weinheim (1984).
- DAVIS P.J., YANG S.K., SMITH R.V.: Microbial Models of Mammalian Metabolism: Microbial Reduction and Oxidation of Pentoxifylline. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 327-331 (1984).
- DAVIS P.J., ABDEL-MAKSoud H., TRAINOR T.M., VOURES P., NEUMEYER J.L.: Stereospecific Microbiological 10-O-Demethylation of R-(-)-10,11-Dimethoxyaporphines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 407-412 (1985).
- DELUCA V., BALSEVICH J., KURZ W.G.W.: Acetyl Coenzyme A : Deacetylvindoline O-Acetyltransferase, A Novel Enzyme from *Catharanthus*. *J. Plant Physiol.* 121, 417-428 (1985).
- DELUCA V., BALSEVICH J., TYLER R.T., EILERT U., PANCHUK B.D., KURZ W.G.W.: Biosynthesis of Indole Alkaloids: Developmental Regulation of the Biosynthetic Pathway from Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 125, 147-156 (1986).

- DELUCA V., BALSEVICH J., TYLER R.T., KURZ W.G.W.: Characterisation of a novel N-Methyltransferase (NMT) from *Catharanthus roseus* plants
Plant Cell Reports 6, 5458-461 (1987).
- DELUCA V., CUTLER A.J.: Subcellular Localization of Enzymes Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*.
Plant Physiol. 85, 1099-1102 (1987).
- DELUCA V., FERNANDEZ J.A., CAMPBELL D., KURZ W.G.W.: Developmental Regulation of Enzymes of Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*.
Plant Physiol. 86, 447-450 (1988).
- DEUS-NEUMANN B., STÖCKIGT J., ZENK M.H.: Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Catharanthine.
Planta medica 53, 184-188 (1987).
- DEUS-NEUMANN B., ZENK M.H.: Instability of Indole Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures.
Planta medica 50, 427-431 (1984).
- DEUS-NEUMANN B., ZENK M.H.: Accumulation of Alkaloids in Plant Vacuoles Does Not Involve an Ion-Trap Mechanism.
Planta 167, 44-53 (1985).
- DIATTA L., LANGLOIS Y., LANGLOIS N., POTIER P.: N° 124. - Alcaloïdes de *Catharanthus ovalis* Mgf.: Réactivité d'Alcaloïdes du Type Vindoline (et Corrélation avec la Désacétylcathovaline).
Bull. Soc. Chim. France: 671-674 (1975).
- DIELS O., FISCHER E.: Über N-Demethylokodein.
Ber. dtsch. chem. Ges. 47, 2043-2047 (1914).
- DIESPERGER H., MÜLLER C.R., SANDERMANN H., jr.: Rapid Isolation of a Plant Microsomal Fraction by Mg^{2+} -Precipitation.
FEBS Letters 43, 155-158 (1974).
- ECKENRODE F.M., PECZYNSKA-CZOCZ W., ROSAZZA J.P.: Microbial Transformations of Natural Antitumor Agents XVIII: Conversions of Vindoline with Copper Oxidases.
J. Pharm. Sci. 71, 1246-1250 (1982).
- ECKES P., DONN G., WENGENMAYER F.: Gentechnik mit Pflanzen.
Angew. Chem. 99, 392-412 (1987).
- EILERT U., CONSTABEL F., KURZ W.G.W.: Elicitor-stimulation of Monoterpene Indole Alkaloid Formation in Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*.
J. Plant Physiol. 126, 11-22 (1986).
- EILERT U., DELUCA V., KURZ W.G.W., CONSTABEL F.: Alkaloid formation by habituated and tumorous cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*.
Plant Cell Reports 6, 271-274 (1987).

- ENDO T., GOODBODY A., VUKOVIC J., MISAWA M.: Biotransformation of Anhydrovinblastine to Vinblastine by a Cell-Free Extract of *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. *Phytochemistry* 26, 3233-3234 (1987 a).
- ENDO T., GOODBODY A., MISAWA M.: Alkaloid Production in Root and Shoot Cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta medica* 53, 479-482 (1987 b).
- ENDO T., GOODBODY A., VUKOVIC J., MISAWA M.: Enzymes from *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures that Couple Vindoline and Catharanthine to Form 3',4'-Anhydrovinblastine. *Phytochemistry* 27, 2147-2149 (1988).
- ESCHER S., LOEW P., ARIGONI D.: The Role of Hydroxygeraniol and Hydroxynerol in the Biosynthesis of Loganin and Indole Alkaloids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 823-825 (1970).
- FAHN W., GUNDLACH H., DEUS-NEUMANN B., STÖCKIGT J.: Late enzymes of vindoline biosynthesis. Acetyl-CoA : 17-O-deacetylvindoline 17-O-acetyltransferase. *Plant Cell Reports* 4, 333-336 (1985 a).
- FAHN W., LAUSSERMAIR E., DEUS-NEUMANN B., STÖCKIGT J.: Late enzymes of vindoline biosynthesis. S-Adenosyl-L-methionine : 11-O-demethylvindoline 11-O-methyltransferase and unspecific acetyltransferase. *Plant Cell Reports* 4 337-340 (1985 b).
- FARNSWORTH N.R., BLOMSTER R.N., DAMRATOSKI D., MEER W.A., CAMMARATO L.V.: Studies on *Catharanthus* Alkaloids. VI. Evaluation by Means of Thin-Layer Chromatography and Ceric Ammonium Sulfate Spray Reagent. *Lloydia* 27, 302-314 (1964).
- FARNSWORTH N.R.: The Role of Medicinal Plants in Drug Development. In: *Natural Products and Drug Development*. P. Krogsgaard-Larsen, S.B. Christensen, H. Kofod (eds.), Munksgaard, Copenhagen; Nankodo, Tokyo (1984).
- FERGUSON K.A.: Starch-gel Electrophoresis; Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides. *Metabolism, Clin. Exptl.* 13, 985-1002 (1964).
- FONTANEL A., TABATA M.: Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue and Cell Cultures. Present Aspects and Prospects. In: *Nestlé Research News 1886/87*. C. Boella, H. Schelling, C. Schlienger (eds.), Nestlé Ltd., Vevey (1987).
- FRANZ C.: Arzneidrogen. Qualitätssicherung durch Anbau und Züchtung. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 122, 1413-1417 (1982).
- FRANZ C.: Züchtung und Anbau - Chancen für die Qualität pflanzlicher Arzneimitteln. *Pharm. Ztg.* 131, 611-617 (1986).

- FREY M.D., RADOLA B.J.: High resolution preparative isoelectric focusing in layers of granulated gels. *Electrophoresis* 3, 216-226 (1982).
- FRÜHBEIS H., KLEIN R., WALLMEIER H.: Computergestütztes Moleküldesign (CAMD) - ein Überblick. *Angew. Chem.* 99, 413-428 (1987).
- FULTON S.P., CARLSON E.R.: Dye Ligand Affinity Chromatography. *Am. Lab.* 12, 55-6, 58, 60 (1980).
- FURTH A.J.: Removing Unbound Detergent from Hydrophobic Proteins. *Anal. Biochem.* 109, 207-215 (1980).
- FURTH A.J., BOLTON H., POTTER J., PRIDDLE J.D.: Separating Detergent from Proteins. In: *Methods of Enzymology*, Vol. 104. Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. W.B. Jakoby (ed.), Academic Press, Orlando (1984).
- GAMBORG O.L., MÜLLER R.A., OJIMA K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151-158 (1968).
- GIBSON N., SEWELL G.J., SOPER C.J., PARFITT R.T.: Studies on the Microbial Transformation of Benzodiazepines. In: *Third European Congress on Biotechnology*. Verlag Chemie, Weinheim (1984).
- GODTFREDSEN W.O., KORSBY G., LORCK H., VANGEDAL S.: Microbial Hydroxylation of Certain Indole Alkaloids. *Experientia* 14, 88-89 (1958).
- GOEGGEL H., ARIGONI D.: The Mevalonoid Nature of Vindoline and Reserpinine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 538-539 (1965).
- GOODBODY A.E., ENDO T., VUKOVIC J., KUTNEY J.P., CHOI L.S.L., MISAWA M.: Enzymic Coupling of Catharanthine and Vindoline to form 3', 4'-Anhydrovinblastine by Horseradish Peroxidase. *Planta medica* 54, 136-140 (1988 a).
- GOODBODY A., ENDO T., VUKOVIC J., MISAWA M.: The Coupling of Catharanthine and Vindoline to Form 3',4'-Anhydrovinblastine by Haemoproteins and Haemin. *Planta medica* 54, 210-214 (1988 b).
- GOODBODY A.E., WATSON C.D., CHAPPLE C.C.S., VUKOVIC J., MISAWA M.: Extraction of 3',4'-Anhydrovinblastine from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 27, 1713-1717 (1988 c).
- GORMAN M., NEUSS N., SVOBODA G.H., BARNES A.J., CONE N.J.: A Note on the Alkaloids of *Vinca rosea* Linn. (*Catharanthus roseus* G. Don.) II Catharanthine, Lochnericine, Vindoline, and Vindoline. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 48, 256-257 (1959).
- GORMAN M., NEUSS N., BIEMANN K.: *Vinca* Alkaloids. X. The Structure of Vindoline. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1058-1059 (1962).

- GOVINDACHARI T.R., PAI B.R., RAJESWARI S.: Studies in Protoberberine Alkaloids XVII - Neooxyberberine Acetone. Heterocycles 15, 1463-1487 (1981).
- GOVINDACHARI T.R., SANDHYA G., CHANDRASEKHARAN S., RAJAGOPALAN K.: Voaciniol: a New Bisindole Alkaloid from *Voacanga grandifolia* (Miq) Rolfe. J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1137-1138 (1987).
- GÖRG A., POSTEL W., GÜNTHER S., WESER J.: Electrophoretic Methods in Horizontal Systems. In: Electrophoresis '86. M.J. Dunn (ed.), Verlag Chemie, Weinheim (1986).
- GRÖGER D., STOLLE K., FALSHAW C.P.: Isolierung von Deacetylvindolin aus *Catharanthus roseus* G. DON. Naturwissenschaften 52, 132-133 (1964).
- GUÉRITTE F., LANGLOIS N., PÉTIARD V.: Métabolites Secondaires Isolés d'une Culture de Tissus de *Catharanthus roseus*. J. Nat. Prod. 46, 144-148 (1983).
- GUNZER G., HENNRICH N.: Purification of alpha-1-Proteinase Inhibitor by Triazine Dye Affinity Chromatography and Gel Filtration on Fraktogel TSK. J. Chromatogr. 296, 221-229 (1984).
- GUSTAFSON M.E., ROSAZZA J.P.: Microbial Transformations of Vindoline by *Streptomyces griseus*. Characterization of a Reactive Enamine Intermediate. J. Chem. Research (S), 166-167 (1979).
- HAECKEL R., HESS B., LAUTERBORN W., WUSTER K.: Purification and Allosteric Properties of Yeast Pyruvate Kinase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 699-714 (1968).
- HAHLBROCK K., GRISEBACH H.: Biosynthesis of Flavonoids. In: The Flavonoids. T.J. Mabry, J. Mabry (eds.), Chapman and Hall, London (1975).
- HALL E.S., MCCAPRA F., MONEY T., FUKUMOTO K., HANSON J.R., MOOTOO B.S., PHILLIPS G.T., SCOTT A.I.: Concerning the Terpenoid Origin of Indole Alkaloids: Biosynthetic Mapping by Direct Mass Spectrometry. J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 348-350 (1966).
- HALL J.L.: Plasma Membranes. In: Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. J.L. Hall, A.L. Moore (eds.), Academic Press, London (1983).
- HAMILL J.D., PARR A.J., RHODES M.J.C., ROBINS R.J., WALTON N.J.: New Routes to Plant Secondary Products. Bio/Technology 5, 800-804 (1987).
- HAMPP N.: Die Strictosidin-Synthase aus *Rauwolfia serpentina*: Isolierung, Charakterisierung und Arbeiten zur Klonierung eines pflanzlichen Sekundärstoffwechselenzyms. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1986.
- HARGROVE W.W.: Preparation and Activities of Chemically Modified Dimeric *Catharanthus* Alkaloids. Lloydia 27, 340-345 (1964).

- HASSAM S.B., HUTCHINSON C.R.: Biosynthesis of the Dimeric Indole Alkaloids. II. Catharanthine as a Precursor of Vincal leukoblastine. *Tetrahedron Letters* 19, 1681-1684 (1978).
- HEMSCHIED T., ZENK M.H.: Glucosidases Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis of *Catharanthus roseus* Cell Cultures. *FEBS Letters* 110, 187-191 (1980).
- HENRIQUES A., KAN-FAN C., AHOND A., RICHE C., HUSSON H.-P.: Alcaloïdes Indoliniques "Dimères" d'un Type Nouveau. Étude Structurale et Analyse aux Rayons X de l'Ervafoline. *Tetrahedron Letters* 19, 3707-3710 (1978).
- HENRIQUES A., HUSSON H.-P.: Dimeric Indole Alkaloids of a New Type. A Synthetic Approach to the Ervafoline Series. *Tetrahedron Letters* 22, 567-570 (1981).
- HERLEM D., HUBERT-BRIERRE Y., KHUONG-HUU F., GOUTAREL R.: Réactions photochimiques d'amines tertiaires et d'alcaloïdes-III. *Tetrahedron* 29, 2195-2202 (1973).
- HESSE M.: Indolalkaloïde. In: Fortschritte der Massenspektrometrie. Vol. 1. H. Budzikiewicz (ed.), Verlag Chemie, Weinheim (1974).
- HESSE M., MEIER H., ZEEH B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1984).
- HEUKESHOVEN J., DERNICK R.; In: Elektrophorese Forum '83. B.J. Radola (ed.), Kurzfassungen der Vorträge 92-97 (1983).
- HEWICK R.M., HUNKAPILLER M.W., HOOD L.E., DREYER W.J.: A Gas-Liquid Solid Phase Peptide and Protein Sequenator. *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997 (1981).
- HIRATA K., YAMANAKA A., KURANO N., MIYAMOTO K., MIURA Y.: Production of Indole Alkaloids in Multiple Shoot Culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1311-1317 (1987).
- HOLLAND H.L.: Microbial and *in vitro* Enzymic Transformation of Alkaloids. In: The Alkaloids XVIII. R.G.A. Rodrigo (ed.), Academic Press, London (1981).
- INMAN J.K.: Covalent Linkage of Functional Groups, Ligands and Proteins to Polyacrylamid Beads. In: Methods of Enzymology, Vol. XXXIV. Affinity Techniques. Enzyme Purification Part B. W.B. Jakoby, M. Wilchek (eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London (1974).
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN): Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes, Recommendations (1976). *J. Biol. Chem.* 252, 5939-5941 (1977).

- JACOBS E., CLAD A.: Electroelution of Fixed and Stained Membrane Proteins from Preparative Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gels into a Membrane Trap. Anal. Biochem. 154, 583-589 (1986).
- JANOT M.-M., POURRAT H., LE MEN J.: Sur la Tabersonine, Alcaloïde extrait des Graines de *Amsonia Tabernamontana* Walt. (Apocynaceae). Bull. Soc. Chim. France: 707-708 (1954).
- JOVANOVIĆ K., BITTNER E., DEZSERI E., ELES J., SZASZ K.: Selektive Manufacture of Antitumorous Vinblastine, Vincleurosine, and Vincristine from *Vinca rosea*. Ger. Offen 2,124,023 (1971); Chem. Abstr. 76, 44112m.
- JOVANOVIĆ K., SZASZ K., FEKETE G., BITTNER E., DEZSERI E., ELES J.: Vincristine by Oxidation of Vinblastine. Ger. Offen 2,259,447 (1974); Chem. Abstr. 81, 91780r.
- KAMATH S.A., NORAYAN K.A.: Interaction of Ca^{2+} with Endoplasmic Reticulum of Rat Liver: A Standardized Procedure for the Isolation of Rat Liver Microsomes. Anal. Biochem. 48, 53-61 (1972).
- KAN-FAN C., HUSSON H.-P.: Stereochemical Control in the Biomimetic Conversion of Heteroyohimbine Alkaloid Precursors. Isolation of a Novel Key Intermediate. J.C.S. Chem. Commun., 618-619 (1978).
- KEVE T., ZSADON B., FEKETE G., GALAMBOS J., VEZEKENYI F., KOVACS L., SZARVADI B., GAZDAG M.: Eburnan-Derivatives by Oxidation of Tabersonine or Dihydrotabersonine. Hung. Teljes HU 31,724 (1982). Chem. Abstr. 101, 171586d.
- KIESLICH K.: Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds. Thieme Verlag, Stuttgart (1976).
- KNOBLOCH K.H., BERLIN J.: Influence of Medium Composition on the Formation of Secondary Compounds in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Z. Naturforsch. 35c, 551-556 (1980).
- KOHL W., WITTE B., HÖFLE G.: Alcaloïde aus *Catharanthus roseus* Zellkulturen II. Z. Naturforsch. 36b, 1153-1162 (1981).
- KOHL W., WITTE B., HÖFLE G.: Quantitative und qualitative HPLC-Analytik von Indolalkaloiden aus *Catharanthus roseus*-Zellkulturen. Planta medica 47, 177-182 (1983).
- KOSKINEN A., LOUNASMAA M.: The Sarpagine-Ajmaline Group of Indole Alkaloids. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vol 43. W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby (eds.), Springer Verlag, Wien, New York (1983)
- KÖNIG H.: Pharmachemie im Wandel - Probleme und Chancen. Angew. Chem. 19, 802-815 (1980).

- KRISCH K.: Carboxylic Ester Hydrolases. In: The Enzymes Vol V. Hydrolysis, Hydration. P.D. Boyer (ed.), Academic Press, New York (1971).
- KRUEGER R.J., CAREW D.P., LUI J.H.C., STABA E.J.: Initiation, Maintenance and Alkaloid Content of *Catharanthus roseus* Leaf Organ Cultures. *Planta medica* **45**, 56-57 (1982).
- KUBINYI H.: Quantitative Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität. *Chemie i. u. Zeit* **20**, 191-202 (1986).
- KUEHNE M.E., OKUNIEWICZ F.J., KIRKMO C.L., BOHNERT J.C.: Studies in Biomimetic Alkaloid Syntheses. 8. Total Syntheses of the C-14 Epimeric Hydroxyvincadifformines, Tabersonine, a (Hydroxymethyl)-D-norvincadifformine, and the C-20 Epimeric Pandolines. *J. Org. Chem.* **47**, 1335-1343 (1982).
- KUEHNE M.E., PODHOREZ D.E., MULAMBA T., BORNMANN W.G.: Biomimetic Alkaloid Syntheses. 15. Enantioselective Synthesis with Epichlorohydrin: Total Synthesis of (+)-, (-)-, and (±)-Vindoline and a Synthesis of (-)-Vindorosine. *J. Org. Chem.* **52**, 347-353 (1987).
- KURZ W.G.W., CHATSON K.B., CONSTABEL F., KUTNEY J.P., CHOI L.S.L., KOLODZIEJCZYK P., SLEIGH S.K., STUART K.L., WORTH B.R.: Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures IV. Characterization of the 953 Cell Line. *Helv. Chim. Acta* **63**, 1891-1896 (1980).
- KUTNEY J.P.: Studies in Plant Tissue Culture. The Synthesis and Biosynthesis of Indole Alkaloids. *Heterocycles* **25**, 617-640 (1987).
- KUTNEY J.P., BROWN R.T., PIERS E., HADFIELD J.R.: Total Synthesis of Indole and Dihydroindole Alkaloids. III. The Transannular Cyclization of Carbomethoxydihydrocleavamine and Carbomethoxycleavamine Derivatives. An Approach to Vinca and Iboga Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 1708-1712 (1970).
- KUTNEY J.P., BECK J.F., EGGERS N.J., HANSEN H.W., SOOD R.S., WESCOTT N.D.: Studies on Indole Alkaloid Biosynthesis. VII. The Later Stages of *Aspidosperma* Alkaloid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 7322-7324 (1971).
- KUTNEY J.P., HIBINO T., JAHNGEN E., OKUTANI T., RATCLIFFE A.H., TREASURYWALA A.M., WUNDERLEY S.: Total Synthesis of Indole and Dehydroindole Alkaloids. IX. Studies on the Synthesis of Bisindole Alkaloids in the Vinblastine-Vincristine Series. The Biogenetic Approach. *Helv. Chim. Acta* **59**, 2858-2882 (1976).

- KUTNEY J.P., BUNZLI-TREPP U., CHAN K.K., DE SOUZA J.P., FUJISE Y., HONDA T., KATSUBE J., KLEIN F.K., LEUTWILER A., MOREHEAD S., ROHR M., WORTH B.R.: Total Synthesis of Indole and Dihydroindole Alkaloids. 14. A Total Synthesis of Vindoline. J. Am. Chem. Soc. 100, 4220-4224 (1978).
- KUTNEY J.P., CHOI L.S.L., KOLODZIEJCZYK P., SLEIGH S.K., STUART K.L., WORTH B.R., KURZ W.G.W., CHATSON K.B., CONSTABEL F.: Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* Cell Cultures. III. Catharanthine and other Alkaloids from the 200 GW Cell Line. Heterocycles 14, 766-768 (1980 a).
- KUTNEY J.P., CHOI L.S.L., WORTH B.R.: Radioimmunoassay Determination of Vindoline. Phytochemistry 19, 2083-2087 (1980 b).
- KUTNEY J.P., CHOI L.S.L., HONDA T., LEWIS N.G., SATO T., STUART K.L., WORTH B.R.: Biosynthesis of the Indole Alkaloids. Cell-free Systems from *Catharanthus roseus* Plants. Helv. Chim. Acta 65, 2088-2101 (1982).
- KUTNEY J.P., AWERYN B., CHOI L.S.L., HONDA T., KOLODZIEJCZYK P., LEWIS N.G., SATO T., SLEIGH S.K., STUART K.L., WORTH B.R.: Studies in Plant Tissue Culture. The Synthesis and Biosynthesis of Indole Alkaloids. Tetrahedron 39, 3781-3795 (1983).
- KUTNEY J.P., BOULET C.A., CHOI L.S.L., GUSTOWSKI W., MCHUGH M., NAKANO J., NIKAIDO T., TSUKAMOTO H., HEWITT G.M., SUEN R.: Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON Cell Cultures XIV. The Role of Unstable Dihydropyridinium Intermediates in the Biosynthesis of Bisindole Alkaloids. Heterocycles 27, 613-620 (1988 a).
- KUTNEY J.P., BOTTA B., BOULET C.A., BUSCHI C.A., CHOI L.S.L., GOLINSKI J., GUMULKA M., HEWITT G.M., LEE G., MCHUGH M., NAKANO J., NIKAIDO T., ONODERA J., PEREZ I., SALISBURY P., SINGH M., SUEN R., TSUKAMOTO H.: Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON Cell Cultures. XVI. Biotransformation of 3',4'-Anhydrovinblastine with *Catharanthus roseus* Cell Cultures and Enzyme Systems. Heterocycles 27, 629-637 (1988 b).
- KUTNEY J.P., BOULET C.A., CHOI L.S.L., GUSTOWSKI W., MCHUGH M., NAKANO J., NIKAIDO T., TSUKAMOTO H., HEWITT G.M., SUEN R.: Alkaloid Production in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON Cell Cultures XV. Synthesis of Bisindole Alkaloids by Use of Immobilized Enzyme Systems. Heterocycles 27, 621-628 (1988 c).
- LAEMMLI U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 244, 680-685 (1970).

- LANGLOIS N., GUÉRITTE F., LANGLOIS Y., POTIER P.: Application of a Modification of the Polonovski Reaction to the Synthesis of Vinblastine-type Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7017-7024 (1976).
- LANGLOIS N., POTIER P.: Antitumour Alkaloids of the Vinblastine-type: is Leurosine an Artefact? *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 102-103 (1978).
- LANGLOIS N., POTIER P.: Antitumour Alkaloids of the Vinblastine-type: Air Oxidation of Anhydrovinblastine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 582-584 (1979).
- LAPINJOKI S., VERÄJÄNKORVA H., HEISKANEN J., NISKANEN M., HUHTIKANGAS A., LOUNASMAA M.: Immunoanalytical Methods for Screening Vindoline from *Catharanthus roseus* Cell Cultures. *Planta medica* **53**, 565-567 (1987).
- LEEGOOD R.C., WALKER D.A.: Chloroplasts. In: Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells. J.L. Hall, A.L. Moore (eds.), Academic Press, London (1983).
- LEETE E.: Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids. I. The Incorporation of Tryptophan into Ajmaline. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6338-6342 (1960).
- LEETE E., AHMAD A., KOMPIS I.: Biosynthesis of the Vinca Alkaloids. I. Feeding Experiments with Tryptophan-2-¹⁴C and Acetate-1-¹⁴C. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4168-4174 (1965).
- LEETE E., UEDA S.: Biosynthesis of the Vinca Alkaloids. The Incorporation of Geraniol-3-¹⁴C into Catharanthine and Vindoline. *Tetrahedron Letters* **40**, 4915-4918 (1966).
- LEONARD N.J., HAUCK F.P., Jr.: Unsaturated Amines. X. The Mercuric Acetate Route to Substituted Piperidines, β^2 -Tetrahydropyridines and β^2 -Tetrahydroanabasines. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5279-5292 (1957).
- LINEWEAVER H., BURK D.: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-666 (1934).
- LINSMAIER E.M., SKOOG F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **18**, 100-125 (1965).
- LOEW P., GOEGGEL H., ARIGONI D.: A Monoterpene Precursor in the Biosynthesis of Indole Alkaloids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 347-348 (1966).
- LOEW P., ARIGONI D.: The Biological Conversion of Loganin into Indole Alkaloids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 137-138 (1968).
- LOO Y.H., REIDENBERG M.: Microbial Oxidation of Indole Alkaloids. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 257-260 (1959).

- LOWE C.R., PEARSON J.C.: Affinity Chromatography on Immobilized Dyes. In: Methods of Enzymology, Vol. 104. Enzyme Purification and Related Techniques. Part C. W.B. Jakoby (ed.), Academic Press, Orlando (1984).
- LUCKNER M., DIETRICH B.: Biosynthesis of Cardenolides in Cell Cultures of *Digitalis lanata* - The Result of a New Strategy. In: Plant Tissue and Cell Culture. C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer (eds.), A.R. Liss Inc., New York (1987).
- MADYASTHA K.M., GUARNACCIA R., BAXTER C., COSCIA C.J.: S-Adenosyl-L-Methionin : Loganic Acid Methyltransferase. A Carboxyl-Alkylating Enzyme from *Vinca rosea*. J. Biol. Chem. 248, 2497-2501 (1973).
- MALLETT G.E., FUKUDA D.S., GORMAN M.: Microbiological Conversions of Catharanthus Alkaloids. Lloydia 27, 334-339 (1964).
- MANGENEY R., ANDRIAMIALISOA R.Z., LANGLOIS N., LANGLOIS Y., POTIER P.: Preparation of Vinblastine, Vincristine, and Leurosidine, Antitumour Alkaloids from *Catharanthus* spp. (Apocynaceae). J. Am. Chem. Soc. 101, 2243-2245 (1979).
- MARCH J.: Advanced Organic Chemistry. Reaction, Mechanisms and Structure. John Wiley & Sons, New York (1985).
- MARKERT C.L., WHITT G.S.: Molecular Varieties of Isozymes. Experientia 24, 977-1088 (1968).
- MASAMUNE S., ANG S.K., EGLI C., NAKATSUKA N., SARKAR S.K., YASUNARI Y.: The Synthesis of Ajmaline. J. Am. Chem. Soc. 89, 2506-2507 (1967).
- MASHIMO K., SATO Y.: On the Synthesis of Ajmaline. Tetrahedron Letters 11, 905-906 (1969).
- MATSUMOTO I., ITO Y., SENO N.: Preparation of Affinity Adsorbents with Toyopearl Gels. J. Chromatogr. 239, 747-754 (1982).
- MCCAPRA F., MONEY T., SCOTT A.I., WRIGHT I.G.: Biosynthesis of the Indole Alkaloids: Vindoline. J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 537-538 (1965).
- MCFARLANE J.K., MADYASTHA K.M., COSCIA C.J.: Regulation of Secondary Metabolism in Higher Plants. Effect of Alkaloids on a Cytochrome P-450 Dependent Monooxygenase. Biochim. Biophys. Res. Comm. 66, 1263-1269 (1975).
- MCLAUCHLAN W.R., HASAN M., BAXTER R.L., SCOTT A.I.: Conversion of Anhydrovinblastine to Vinblastine by Cell-free Homogenates of *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. Tetrahedron 39, 3777-3780 (1983).
- MEEHAN T.D., COSCIA C.J.: Hydroxylation of Geraniol and Nerol by a Monooxygenase from *Vinca rosea*. Biochim. Biophys. Res. Comm. 53, 1043-1048 (1973).

- MÉRILLON J.M., DOIREAU P., GUILLOT A., CHÉNIEUX J.C.,
RIDEAU M.: Indole Alkaloid Accumulation and Tryptophan
Decarboxylase Activity in *Catharanthus roseus* Cells
Cultured in Three Different Media.
Plant Cell Reports 5, 23-26 (1986).
- MERSEY B.G., CUTLER A.J.: Differential Distribution of
Specific Indole Alkaloids in Leaves of *Catharanthus
roseus*.
Can. J. Bot. 64, 1039-1046 (1986).
- MISAWA M., ENDO T., GOODBODY A., VUKOVIC J., CHAPPLE C.,
CHOI L., KUTNEY J.P.: Synthesis of Dimeric Indole
Alkaloids by Cell-Free Extracts from Cell Suspension
Cultures of *Catharanthus roseus*.
Phytochemistry 27, 1355-1359 (1988).
- MIZUSAKI S., TANABE Y., NOGUCHI M., TAMAKI E.: Phytochemical
Studies on Tobacco Alkaloids XIV. The Occurrence and
Properties of Putrescine N-Methyltransferase in Tobacco
Roots.
Plant Cell Physiol. 12, 633-640 (1971).
- MORRIS P.: Regulation of Product Synthesis in Cell Cultures of
Catharanthus roseus. III. Alkaloid Metabolism in Cultured
Leaf Tissue and Primary Callus.
Planta medica 52, 127-132 (1986 a).
- MORRIS P.: Regulation of Product Synthesis in Cell Cultures of
Catharanthus roseus. II. Comparison of Production Media.
Planta medica 52, 121-126 (1986 b).
- MOZA B.K., TROJANEK J.: New Alkaloids from *Catharanthus roseus*
G. DON.
Chem. Ind. (London), 1425-1427 (1962).
- MOZA B.K., TROJANEK J., HANUS V., DOLEJS L.: On Alkaloids.
XIII. On the Mass Spectra of Vindorosine.
Coll. Czech. Chem. Commun. 29, 1913-1921 (1964).
- NA G.C., TIMASHEFF S.N.: *In Vitro* Vinblastine-induced Tubulin
Paracrystals.
J. Biol. Chem. 257, 10387-10391 (1982).
- NABIH T., YOUEL L., ROSAZZA J.P.: Microbial Transformations of
Natural Antitumor Agents. Part 5. The Structure of a
Novel Vindoline Dimer produced by *Streptomyces griseus*.
J. Chem. Soc. Perkin Trans I: 757-762 (1978).
- NAGAKURA N., RÜFFER M., ZENK M.H.: The Biosynthesis of
Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 2308-2312 (1979).
- NEUSS N.: The Spectrum of Biological Activities of Indole
Alkaloids. In: Indole and Biogenetically Related
Alkaloids. J.D. Phillipson, M.H. Zenk (eds.), Academic
Press, London (1980).
- NEUSS N., GORMAN M., BOAZ H.E., CONE N.J.: Vinca Alkaloids.
XI. Structures of Leurocristine (LCR) and Vincalab-
blastine (VLB).
J. Am. Chem. Soc. 84, 1509-1510 (1962).

- NEUSS N., GORMAN M., CONE N.J.: The Structures of the Oncolytic Alkaloids Vinblastine (VLB) and Vincristine (VCR) from *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*).
Lloydia 27, 389-392 (1964).
- NEUSS N., FUKUDA D.S., MALLETT G.E., BRANNON D.R., HUCKSTEP L.L.: *Vinca* Alkaloids XXXII. Microbiological Conversions of Vindoline, a Major Alkaloid from *Vinca rosea* L.
Helv. Chim. Acta 56, 2418-2426 (1973 a).
- NEUSS N., BRANNON D.R., MALLETT G.E., HUCKSTEP L.L., FUKUDA D.S.: Microbiological Conversion of Vindoline, a Major Alkaloid from *Vinca rosea*.
Lloydia 36, 433-434 (1973 b).
- NEUSS N., FUKUDA D.S., BRANNON D.R., HUCKSTEP L.L.: *Vinca* Alkaloids XXXIV. Preparation of Des-N_a-methyl-vindoline by Microbiological Conversion of Vindoline, a Major Alkaloid from *Vinca rosea* L.
Helv. Chim. Acta 57, 1891-1893 (1974).
- PAN C.S., WEISENBORN F.L.: Microbial Transformation of Rauwolfia Alkaloids.
J. Am. Chem. Soc. 80, 4749 (1958).
- PATTERSON E.L., ANDRES W.W., KRAUSE E.F., HARTMAN R.E., MITSCHER L.A.: The Microbiological Transformation of Some Yohimbine Type Alkaloids.
Arch. Biochem. Biophys. 103, 117-123 (1963).
- PAWELKA K.H.: Monoterpeneoide Indolalkaloide aus pflanzlichen Zellkulturen.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1985
- PECZYNSKA-CZOCZ W., MORDARSKI M.: Transformation of Xenobiotics. In: The Biology of the Actinomycetes. M. Goodfellow, M. Mordarski, S.T. Williams (eds.), Academic Press, London (1983).
- PETERSON D.H., MURRAY H.C.: Microbial Oxygenation of Steroids at Carbon 11.
J. Am. Chem. Soc. 74, 1871-1872 (1952).
- PETIARD V., COURTOIS D., GUERITTE F., LANGLOIS N., MOMPON B.: New Alkaloids in Plant Tissue Cultures. In: Plant Tissue Culture 1982. A. Fujiwara (ed.), Maruzen, Tokyo (1982).
- PFISTER J.R.: Convenient Synthesis of *N*-Noratropine.
J. Org. Chem. 43, 4373-4374 (1978).
- PFITZNER A.: Die Biosynthese der Rauwolfia-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1984
- PFITZNER U.: Die Strictosidin-Synthase aus *Catharanthus roseus* Zellkulturen: Reinigung, Immunologische Charakterisierung und Immobilisierung eines Enzyms aus dem Sekundärstoffwechsel.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1984

- POLZ L., SCHÜBEL H., STÖCKIGT J.: Characterization of 2 β (R)-17-O-Acetyajmalan: Acetylsterase - a Specific Enzyme Involved in the Biosynthesis of the *Rauwolfia*-Alkaloid Ajmaline. *Z. Naturforsch.* **42c**, 333-342 (1987).
- QURESHI A.A., SCOTT A.I.: Biosynthesis of Indole Alkaloids: Sequential Precursor Formation and Biological Conversion in *Vinca rosea*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*: 948-950 (1968).
- RADOLA B.J.: Ultrathin-Layer Isoelectric Focusing in 50-100 μ m Polyacrylamide Gels on Silanized Glass Plates or Polyester Films. *Electrophoresis* **1**, 43-56 (1980).
- RAHMAN A.U.: Nuclear Magnetic Resonance. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg Tokyo (1986).
- RAHMAN A.U., BASHIR M., FATIMA J., MISTRY A.H.: A Rapid Procedure for the Isolation of Vinblastine from the Leaves of *Catharanthus roseus*. Pakistan Patent 141/87 (1982).
- RAHMAN A.U., ALI I., BASHIR M.: Gomaline - A New Indolenine Alkaloid from *Catharanthus roseus*. *Heterocycles* **22**, 85-86 (1984 a).
- RAHMAN A.U., ALI I., BASHIR M.: Isolation and Structural Studies on the Alkaloids in Flowers of *Catharanthus roseus*. *J. Nat. Prod.* **47**, 554-555 (1984 b).
- RAHMAN A.U., ALI I., CHAUDHRY M.I.: Isolation and ^{13}C -NMR Studies on Cathovaline, an Alkaloid from the Leaves of *Catharanthus roseus*. *Planta medica* **51**, 447-448 (1985).
- RASOANAIVO P., LANGLOIS N., POTIER P.: Alcaloïdes du *Catharanthus longifolius*. *Phytochemistry* **11**, 2616-2617 (1972).
- REIBER H.G., STEWART T.D.: The Tetra Alkyl Methylene Immonium Salts. *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 3026-3030 (1940).
- REINHARD E., ALFERMANN A.W.: Biotransformation by Plant Tissue Culture. In: *Advances in Biochemical Engineering. Plant Cell Cultures*. Vol 16. A. Fiechter (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1980).
- RICHTER I., STOLLE K., GRÖGER D., MOTHES K.: Über Alkaloidbildung in Gewebekulturen von *Catharanthus roseus* G. Don. *Naturwissenschaften* **11**, 305-306 (1965).
- RINDERKNECHT H., WILDING P., HAVERBACK B.J.: A New Method for the Determination of α -Amylase. *Experientia* **23**, 805 (1967).
- ROSAZZA J.P.: Microbial Transformations of Natural Antitumor Agents. *Lloydia* **41**, 297-311 (1978).

- ROSAZZA J.P., SMITH R.V.: Microbial Models of Mammalian Metabolism. Aromatic Hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys. 161, 551-558 (1974).
- ROSAZZA J.P., KAMMER M., YOEEL L., SMITH R.V., ERHARDT P.W., TRUONG D.H., LESLIE S.W.: Microbial Models of Mammalian Metabolism. O-Demethylations of Papaverine. Xenobiotica 7, 133-143 (1977).
- ROTE LISTE 1987. Verzeichnis der Fertigarzneimittel der Mitglieder des BPI e.V. Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V. (ed.), Frankfurt (1987)..
- SAHU B.N.: Rauwolfias. Vol. I Botany and Agronomy. Today's and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi (1979).
- SAKIHAMA N., OHMORI H., SUGIMOTO N., YAMASAKI Y., OSHINO R., SHIN M.: Toyopearl HW-65 C: Ammonium Sulfate Column as a New Chromatographic Adsorbent for Enzyme Purification. J. Biochem. 92, 129-134 (1983).
- SANTAMARIA J., HERLEM D., KHUONG-HUU F.: Oxydation Photochimique d'Amines Tertiaires et d'Alkaloides VIII Oxidation Photochimique d'Alkaloides Indolino-Indolizidiques, Vincadifformine, Tabersonine, N_(a)-Acétyl Dihydro-2,16 Vincadifformine, et N_(a)-Acétyl Dihydrotabersonine. Tetrahedron 33, 2389-2392 (1977).
- SARIASLANI F.S., ECKENRODE F.M., BEALE J.M., Jr., ROSAZZA J.P.: Formation of a Reactive Iminium Derivative by Enzymatic and Chemical Oxidations of 16-O-Acetylvindoline. J. Med. Chem. 27, 749-754 (1984).
- SARIASLANI F.S., DUFFEL M.W., ROSAZZA J.P.: One-Electron Oxidation of Vindoline and 16-O-Acetylvindoline Catalyzed by Peroxidase. J. Med. Chem. 28, 629-633 (1985).
- SCHÜBEL H.: Biosyntheseintermediate als Ausgangsverbindungen biomimetisch orientierter Alkaloidsynthesen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1986
- SCHÜBEL H., STÖCKIGT J.: RLCC-Isolation of Raucaffricine from its Most Efficient Source - Cell Suspension Cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. Plant Cell Reports 3, 72-74 (1984).
- SCOPES R.: Protein Purification. Principles and Methods. In: Springer Advanced Texts in Chemistry. C.R. Cantor (ed.), Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1983).
- SCOTT A.I.: Biosynthesis of Indole Alkaloids. Acc. Chem. Res. 3, 151-157 (1970).
- SCOTT A.I., LEE S.-L.: Biosynthesis of Indole Alkaloids. A Cell-Free System of *Catharanthus roseus*. J. Am. Chem. Soc. 97, 6906-6908 (1975).

- SCOTT A.I., GUÉRITTE F., LEE S.-L.: Role of Anhydrovinblastine in the Biosynthesis of the Antitumor Dimeric Indole Alkaloids.
J. Am. Chem. Soc. 100 6253-6255 (1978).
- SCOTT A.I., MIZUKAMI H., HIRATA T., LEE S.-L.: Formation of Catharanthine, Akuammicine and Vindoline in *Catharanthus roseus* Suspension Cells.
Phytochemistry 19, 488-489 (1980).
- SEWELL G.J., SOPER C.J., PARFITT R.T.: Preliminary Investigations into Microbial N-Dealkylation.
J. Pharm. Pharmacol. 31, 90P, (1979).
- SHAMMA M., HINDENLANG D.M.: Carbon-13 NMR Shift Assignments of Amines and Alkaloids. Plenum Press, New York, London (1979).
- SHETE M.K., BHANUSHAH S.S., SHETE P.M.: Isolation of Vinblastine and Vincristine or the Salts thereof.
Indian IN 155,986 (1984);
Chem. Abstr. 104, 165696k.
- SIDDIQUI S., SIDDIQUI R.H.: Chemical Examination of the Roots of *Rauwolfia serpentina* Benth.
J. Indian Chem. Soc. 8, 667-680 (1931).
- SLUYTERMAN L.A.E., ELGERSMA O.: Isoelectric Focusing on Ion-Exchange Columns. I. General Principles.
J. Chromatogr. 150, 17-30 (1978).
- SMITH J.I., SMART N.J., KURZ W.G.W., MISAWA M.: Stimulation of Indole Alkaloid Production in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* by Abscissic Acid.
Planta medica 53, 470-474 (1987 a).
- SMITH J.I., SMART N.J., MISAWA M., KURZ W.G.W., TALLEVI S.G., DICOSMO F.: Increased Accumulation of Indole Alkaloids by Some Cell Lines of *Catharanthus roseus* in Response to Addition of Vanadyl Sulfate.
Plant Cell Reports 6, 142-145 (1987 b).
- STAPLEFORD K.S.J.: The Indole Alkaloids. In: Rodd's Chemistry of Carbon Compounds. Suppl. to 2nd. ed. Vol. IV Part B. Heterocyclic Compounds. M.F. Ansell (ed.), Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York (1985).
- STÖCKIGT J., ZENK M.H.: Strictosidine (Isovincoside): The Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids.
J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 646-648 (1977).
- STÖCKIGT J., SOLL H.J.: Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus* and *C. ovalis*.
Planta medica 40, 22-30 (1980).
- STÖCKIGT J., PFITZNER A., FIRL J.: Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth.
Plant Cell Reports 1, 36-39 (1981).

- STÖCKIGT J., PAWELKA K.H., TANAHASHI T., DANIELI B., HULL W.:
Voafrine A and Voafrine B, New Dimeric Indole Alkaloids
from Cell Suspension Cultures of *Voacanga africana* Stapf.
Helv. Chim. Acta 66, 2525-2533 (1984).
- STÖCKIGT J., GUNDLACH H., DEUS-NEUMANN B.: Disproof of the
Overall Enzymatic Biosynthesis of Vindoline from
Tryptamine and Secologanin by Cell-Free Extracts from the
Leaves of *Catharanthus roseus* (L.) G. DON.
Helv. Chim. Acta 68, 315-318 (1985).
- STUART K.L., KUTNEY J.P., HONDA T., WORTH B.R.: Intermediacy
of 3',4'-Dehydrovinblastine in the Biosynthesis of
Vinblastine-Type Alkaloids.
Heterocycles 9, 1419-1427 (1978 a).
- STUART K.L., KUTNEY J.P., HONDA T., WORTH B.R.: Studies on the
Biosynthesis of Bisindole Alkaloids. The Final Stages in
Biosynthesis of Vinblastine, Leurosine and Catharine.
Heterocycles 9, 1391-1396 (1978 b).
- STUART K.L., KUTNEY J.P., HONDA T., LEWIS N.G., WORTH B.R.:
The Biosynthesis of Vindoline Using Cell Free Extracts
from Mature *Catharanthus roseus* Plants.
Heterocycles 9, 647-652 (1978 c).
- SVENNISON H.: Isoelectric Fractionation, Analysis and
Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients.
The Differential Equation of Solute Concentrations at a
Steady State and its Solution for Simple Cases.
Acta Chem. Scand. 15, 325-341 (1961).
- SVOBODA G.H., NEUSS N., GORMAN M.: Alkaloids of *Vinca rosea*
Linn. (*Catharanthus roseus* G.Don.) V. Preparation and
Characterization of Alkaloids.
J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 48, 659-666 (1959).
- SVOBODA G.H.: The Methodology of Selective Extraction and
Gradient pH Extraction Techniques.
Lloydia 27, 299-301 (1964).
- SVOBODA G.H., BLAKE D.A.: Phytochemistry and Pharmacology of
C. roseus. In: The *Catharanthus* Alkaloids. W.I. Taylor,
N.R. Farnsworth (eds.), Marcel Dekker Inc., New York
(1975).
- TAKANO S., HATAKEYAMA S., OGASAWARA K.: Synthesis of the Non-
Tryptamine Moiety of the Aspidosperma-Type Indole
Alkaloids via Cleavage of Cyclic α -Diketone
Monothioacetal. An Efficient Synthesis of (dl)-
Quebrachamine and a Formal Synthesis of (dl)-Tabersonine.
J. Am. Chem. Soc. 98, 3022-3023 (1976).
- TALLEVI S.G., DICOSMO F.: Stimulation of Indole Alkaloid
Content in Vanadium-Treated *Catharanthus roseus*
Suspension Cultures.
Planta medica 54, 149-152 (1988).
- TEUSCHER E.: Probleme der Produktion sekundärer Pflanzenstoffe
mit Hilfe von Zellkulturen.
Pharmazie 28, 6-18 (1973).

- THOMAS R.: A Possible Biosynthetic Relationship Between the Cyclopentanoid Monoterpenes and the Indole Alkaloids. *Tetrahedron Letters* 16, 544-553 (1961).
- THOMPSON S.T., CASS K.H., STELLWAGEN E.: Blue Dextran-Sepharose: An Affinity Column for the Dinucleotide Fold in Proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 669-672 (1975).
- TIN-WA M., FONG H.H.S., ABRAHAM D.J., TROJANEK J., FARNSWORTH N.R.: Structure of Sanguidimerine, a New Major Alkaloid from *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae). *J. Pharm. Sci.* 61, 1846-1847 (1972).
- TIN-WA M., FARNSWORTH N.R.: Phytochemistry of Minor Catharanthus Species. In: The Catharanthus Alkaloids. W.I. Taylor, N.R. Farnsworth (eds.), Marcel Dekker Inc., New York (1975).
- TREIMER J.F., ZENK M.H.: Purification and Properties of Strictosidine-Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. *Eur. J. Biochem.* 101, 225-233 (1979).
- TYLER R.B., KURZ W.G.W., PANCHUK P.B.: Photoautotrophic Cell Suspension Cultures of Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don): Transition from Heterotrophic to Photoautotrophic Growth. *Plant Cell Reports* 3, 195-198 (1986).
- UESATO S., MATSUDA S., INOUE H.: Mechanism for Iridane Skeleton Formation from Acyclic Monoterpenes in the Biosynthesis of Secologanin and Vindoline in *Catharanthus roseus* and *Lonicera morrowii*. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1671-1674 (1984).
- UESATO S., OGAWA Y., INOUE H., SAIKI K., ZENK M.H.: Synthesis of Iridodial by Cell Free Extracts from *Rauwolfia serpentina* Cell Suspension Cultures. *Tetrahedron Letters* 27, 2893-2896 (1986).
- ULBRICH B., ZENK M.H.: Partial Purification of Hydroxycinnamoyl-CoA: Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase from Higher Plants. *Phytochemistry* 18, 929-933 (1979).
- VAN TAMELEN E.E., OLIVER L.K.: The Biogenetic Type Total Synthesis of Ajmaline. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 2136-2137 (1970).
- VITALI R., PIGHI R.: Vincamine. *Belg. BE* 898,073 (1984). *Chem. Abstr.* 101, 38721c.
- WALSH C.: Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman & Co, San Francisco (1981).
- WAT C.-K., STEFFENS P., ZENK M.H.: Partial Purification and Characterization of S-Adenosyl-L-Methionine: Norreticuline N-Methyltransferases from *Berberis* Cell Suspension Cultures. *Z. Naturforsch.* 41c, 126-134 (1986).

- WATSON T.R., CHEUNG H.T.A., THOMAS R.E.: Structure-Activity Studies in Cardiac Glycosides. In: Natural Products and Drug Development. P. Krogsgaard-Larsen, S.B. Christensen, H. Kofod (eds.), Munksgaard, Copenhagen; Nankodo, Tokyo (1984).
- WEBER K., OSBORN M.: The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969).
- WENKERT E.: Biosynthesis of Indole Alkaloids. The Aspidosperma and Iboga Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 98-102 (1962).
- WESTEKEMPER P., WIECZOREK U., GUÉRITTE F., LANGLOIS N., LANGLOIS Y., POTIER P., ZENK M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of the Indole Alkaloid Vindoline in Catharanthus. *Planta medica* **39**, 24-37 (1980).
- WESTERMEIER R.: SDS-Gradientengel-Elektrophorese in horizontalen dünnen Gelen. Application Note SD/RE-058. LKB Instrument GmbH, Gräfelfing (1985).
- WINK M., HARTMANN T.: Localization of the Enzymes of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Leaf Chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physiol.* **70**, 74-77 (1982).
- WU G.S., NABIH T., YOUEL L., PECZYNSKA-CZOCZ W., ROSAZZA J.P.: Microbial Transformations of Natural Antitumor Agents: O-Demethylation of Vindoline by *Sepedonium chrysospermum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 601-604 (1978).
- ZENK M.H., EL-SHAGI H., ARENS H., STÖCKIGT J., WEILER E.W., DEUS B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, Proceedings in Life Science. W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenk (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977).
- ZENK M.H.: Enzymology of Benzyloisochinoline Alkaloid Formation. In: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. J.D. Phillipson, M.F. Roberts, M.H. Zenk (eds.), Springer Verlag Berlin (1985).
- ZIEGLER F.E., BENNETT G.B.: The Claisen Rearrangement in Indole Alkaloid Synthesis. The Total Synthesis of (±)-Tabersonine. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 7458-7464 (1973).
- ZSADON B.: Tabersonine - Potential Raw Material of Vegetative Origin Suitable for the Partial Synthesis of Indolic Alkaloids Used in the Pharmaceutical Industry and Research Work. *Herba Hung.* **21**, 217-223 (1982).

Danksagung

Herrn Prof.Dr.J.Stöckigt, der mir freundlicherweise die Bearbeitung dieses Themas überließ, danke ich an dieser Stelle sehr herzlich. Seine Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Zustandekommen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Prof.Dr.M.H.Zenk ist vielmals für die guten Arbeitsmöglichkeiten am Lehrstuhl zu danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr.H.Schübel, der mit Messung und Hilfestellung bei der Interpretation der NMR-Spektren Anteil an dieser Arbeit genommen hat. Frau Prof.Dr.H.Schrempf darf ich für die Ermöglichung von mikrobiellen Arbeiten im präparativen Maßstab danken.

Den Firmen Eli Lilly (USA) und Omnicem (Belgien) sei für die großzügigen Spenden von Reinalkaloiden gedankt.

Finanzielle Unterstützung wurde in dankenswerter Weise vom Bundesminister für Forschung und Technologie (Bonn) als Projekt Nr. 0319000A7 sowie vom Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn) als Teilprojekt C4 gewährt. Empfänger der Finanzmittel war Prof.Dr.J.Stöckigt.

Lebenslauf

Am 10. Mai 1960 wurde ich, Walter Anton Fahn, als Sohn des Polizeibeamten Ludwig Fahn und seiner Ehefrau Hildegard Fahn, geb. Rief, in München geboren.

Im Jahre 1966 wurde ich eingeschult und besuchte 1970 - 1979 das Dante-Gymnasium in München, wo ich 1979 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1979/80 nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Pharmazie auf, das im April 1983 mit dem zweiten Abschnitt des pharm. Staatsexamens beendet wurde.

Nach einjährigem Praktikum in der Mathias-Apotheke in München bestand ich im Juli 1984 die Pharmazeutische Prüfung und erhielt ebenfalls im Juli 1984 die Approbation als Apotheker.

Im Mai 1984 begann ich unter Anleitung von Herrn Doz.Dr.J.Stöckigt mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Von Mai 1984 bis April 1988 hatte ich eine Stelle als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München inne.

